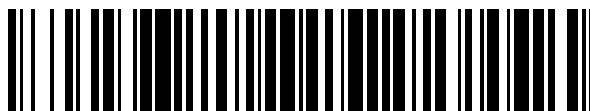


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 155**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2016 PCT/EP2016/072066**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017 WO17046391**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2016 E 16766559 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 3283506**

54 Título: **Procedimiento de fabricación de anexina V**

30 Prioridad:  
**17.09.2015 GB 201516516**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.02.2019**

73 Titular/es:  
**ANNEXIN PHARMACEUTICALS AB (100.0%)  
Norrullsgatan 6  
113 29 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:  
**MOKS, TOOMAS y  
REICH, JAN CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 699 155 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de fabricación de anexina V

**Campo de la invención**

5 La presente solicitud se refiere a procedimientos para la fabricación de la proteína que comprende la secuencia de anexina A5 (AnxA5). Más concretamente, al procedimiento para la recuperación y/o purificación de una proteína AnxA5 expresada de forma recombinante a partir de una célula huésped recombinante productora de endotoxinas con una pared celular, tal como una célula huésped bacteriana. Los procedimientos descritos en el presente documento son altamente eficaces y rentables, y se pueden usar a escala comercial (por ejemplo, con cultivos de células huésped recombinantes con un volumen de cultivo de aproximadamente 1000 L o más) para producir de manera rápida y conveniente un producto de proteína AnxA5 de grado farmacéutico.

**Antecedentes de la invención**

La indicación o análisis en la presente memoria de un documento aparentemente publicado con anterioridad no debe considerarse necesariamente un reconocimiento de que el documento forma parte del estado de la técnica o es de conocimiento general común.

15 La aterotrombosis, formada sobre una placa aterosclerótica subyacente, es el mecanismo patogénico clave detrás de la mayoría de las enfermedades isquémicas cardiovasculares clínicamente evidentes, incluyendo la enfermedad coronaria aguda, la oclusión cerebrovascular y la oclusión arterial periférica. Como se discutió en Cederholm y Frostegård, 2007, *Drug News Perspect.*, 20(5): 321-6, la anexina A5 (anteriormente conocida como anexina V), miembro de la superfamilia de la anexina, es una proteína con propiedades antitrombóticas potentes y únicas. Se cree que el efecto antitrombótico ejercido por la anexina A5 está mediado principalmente por el blindaje mecánico de los fosfolípidos, en particular de la fosfatidilserina, lo que reduce su disponibilidad para las reacciones de coagulación. Sin embargo, se han observado otras propiedades interesantes de la anexina A5 que potencialmente contribuyen a su función antitrombótica, especialmente la regulación a la baja del factor tisular expresado en la superficie, o la interacción con ligandos adicionales involucrados en la hemostasia tales como la sulfatida y la heparina, así como la regulación positiva del activador del plasminógeno tipo uroquinasa. También se ha sugerido la importancia biológica de la anexina A5 como miembro del sistema antitrombótico endógeno *in vivo* para la vasculatura grande y para la microcirculación placentaria.

De hecho, se sabe que la anexina A5 tiene una amplia gama de utilidades en medicina, al proporcionar efectos terapéuticos directos. Los ejemplos incluyen el uso de la anexina A5:

30 para la prevención de aterotrombosis y/o ruptura de la placa, tal como se describe en el documento WO 2005/099744;  
para el tratamiento de la disfunción vascular, la reducción del dolor isquémico y/o el tratamiento de una ruptura de la enfermedad vascular, tal como se describe en el documento WO 2009/077764;  
para la profilaxis o el tratamiento de la reestenosis, tal como se describe en el documento WO 2009/103977;  
35 para su uso en la inhibición de la actividad de la cardiolipina oxidada (oxCL) y para el tratamiento, la prevención y/o la reducción del riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular, una enfermedad autoinmune o una afección inflamatoria, tal como se describe en el documento WO 2010/069605; y  
para la prevención y/o reducción de las complicaciones perioperatorias o postoperatorias después de una intervención quirúrgica, como las complicaciones después de una cirugía vascular, especialmente la cirugía vascular periférica, tal como se describe en el documento WO 2012/136819.

45 Como tal, la anexina A5 representa una proteína de alto interés y potencial terapéutico. Por lo tanto, existe una necesidad apremiante de un procedimiento eficaz para producir una proteína anexina A5 de grado terapéutico mediante un procedimiento eficaz y rentable que pueda ampliarse y aplicarse de manera conveniente a la producción a escala comercial (por ejemplo, para recoger la proteína anexina A5 de cultivos de células huésped recombinantes con un volumen de cultivo de aproximadamente 1000 L o más).

50 Una dificultad particular, cuando se expresa de forma recombinante la anexina A5 en células huésped bacterianas estándar tales como *E. coli*, es la contaminación con componentes derivados de las células huésped y, en particular, con la endotoxina. La endotoxina es un lipopolisacárido (LPS), que está formado por un lípido y un polisacárido compuesto por un antígeno O, un núcleo externo y un núcleo interno unidos por un enlace covalente; el LPS se encuentra en la membrana externa de las bacterias gramnegativas y provoca respuestas inmunitarias fuertes en los animales. La anexina A5 se caracteriza por su fuerte unión a las membranas biológicas que contienen fosfolípidos con carga negativa, por lo que tiene una afinidad particularmente alta con la endotoxina. Esto hace que la producción a gran escala comercial de anexina A5 a partir de huéspedes productores de endotoxina sea aún más difícil.

55 Hasta la fecha, no se ha desarrollado en absoluto ningún procedimiento para producir proteína anexina A5 de grado terapéutico mediante un procedimiento eficaz y rentable que pueda ampliarse y aplicarse de manera conveniente a la producción a escala comercial (por ejemplo, para recoger la proteína anexina A5 de cultivos de células huésped

recombinantes con un volumen de cultivo de aproximadamente 1000 L o más), y mucho menos de una manera que resuelva la contaminación con endotoxinas.

El documento WO 86/04094 de Biogen N.V. se publicó el 17 de julio de 1986, y se titula “DNA sequences, recombinant DNA molecules and processes for producing human lipocortin-like polypeptides”. El documento EP0430121 A1 de BEHRINGWERKE Aktiengesellschaft se publicó el 25 de junio de 1991 y se titula “Process for the purification of lipocortins”. El documento EP0441274 A2 de BEHRINGWERKE Aktiengesellschaft se publicó el 14 de agosto de 1991 y se titula “Process for the purification of lipocortins”. El documento EP452849 A1 de BEHRINGWERKE Aktiengesellschaft se publicó el 23 de octubre de 1991 y se titula “Anti-PP4 monoclonal antibodies, method for production and use thereof”. El documento EP0457371 A1 de BEHRINGWERKE Aktiengesellschaft se publicó el 21 de noviembre de 1991 y se titula “Method for the isolation of the tissue protein PP4”.

Trotter y col. (1995, Biochem. J., 308:591-598) se titula “Ca<sup>2+</sup> concentration during binding determines the manner in which annexin V binds to membrane”, y describe un procedimiento para evaluar la capacidad de unión de la proteína anexina V obtenida de plaquetas. Zhang y col. (2000, Prep. Biochem. & Biotechnol., 30(4):305-312) se titula “Expression and purification of recombinant human annexin V in Escherichia coli” y enseña el uso de marcadores de histidina (His-tag) de la anexina V para capturar la proteína expresada.

En 1991, Kumar informó sobre el desarrollo de un procedimiento para la producción y purificación de anexina A5 (una tesis de pregrado titulada “Expression, Purification, and Large-Scale Production of the Human Recombinant Annexin-V Protein” tal como fue presentada al Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Arkansas, Fayetteville, AR, disponible en línea en <https://uarkive.uark.edu/xmlui/handle/10826/981>). El procedimiento de Kumar implicó la expresión de la anexina A5 en células huésped recombinantes de *E. coli* en frascos de cultivo de 100 mL, sedimentando las células, resuspendiendo las células en presencia de un tampón de homogeneización/lisis consistente en 50 mM de Tris HCl, 10 mM de CaCl<sub>2</sub> a pH 7,2, y luego rompiendo las células por sonicación para liberar la proteína anexina A5. La adición de CaCl<sub>2</sub> provocó que la anexina A5 se uniera, en función del calcio, a las membranas celulares de los residuos, y luego la mezcla se sometió a una primera etapa de centrifugación de purificación de 20 minutos, tras lo cual se desechó el sobrenadante y se recuperó el sedimento que contenía los residuos celulares y la anexina A5 unida. La anexina A5 se liberó del sedimento usando EDTA, y a esto siguió una segunda etapa de centrifugación de purificación de 20 minutos y la recolección de la anexina A5 en el sobrenadante. A continuación, se realizó una diálisis durante la noche para cambiar el tampón de la anexina A5 a Tris HCl a pH 8,0, antes de la etapa adicional de intercambio aniónico en una columna de DEAE-sefariosa, y la elución de la anexina A5 usando un gradiente de sal.

El presente solicitante se ha dado cuenta de que existen numerosas limitaciones y deficiencias en el procedimiento de Kumar. En primer lugar, solo se demuestra a pequeña escala, usando cultivos de 100 mL, y requiere dos etapas de centrifugación separadas durante el proceso de purificación. Esto no es escalable a procedimientos comerciales que utilizan cultivos de gran volumen (por ejemplo, 1000 L o más) de una manera eficaz. Como se explica más adelante, la centrifugación de volúmenes de fluido tan grandes sería extremadamente costosa y requeriría mucho tiempo. Sin embargo, el enfoque de Kumar requiere la centrifugación, ya que se basa en el uso de la unión inducida por calcio de la anexina A5 a las membranas de los residuos celulares como etapa de captura preliminar. En segundo lugar, el solicitante se ha dado cuenta de que el procedimiento de Kumar provoca grandes pérdidas de proteína anexina A5, por ejemplo, al desechar la anexina A5 soluble que no está unida al sobrenadante del producto de la primera etapa de centrifugación de purificación. En tercer lugar, el procedimiento de Kumar es totalmente incapaz de eliminar la endotoxina a un nivel adecuado para un uso terapéutico, y cabe destacar que no hay controles sobre los niveles de endotoxina en el producto final. Como tal, el procedimiento de Kumar no es escalable a la producción comercial de una manera eficaz y efectiva en términos de tiempo, conduce a altas pérdidas de proteína anexina A5 (es decir, bajos rendimientos) y da como resultado un bajo grado de purificación de proteínas que no es adecuado para uso terapéutico.

Wang y col. (2006, Protein Expression and Purification, 45: 80-87) se titula “Non-fusion expression in Escherichia coli: Single-step purification of recombinant human annexin A5 for detection of apoptosis”.

En 2008, Tait Research Laboratory, del Departamento de Medicina de Laboratorio del Centro Médico de la Universidad de Washington, publicó un documento titulado “Production of Recombinant Annexin V from plasmid pET12a-PAPI”. Está disponible en línea en: <https://depts.washington.edu/labweb/Faculty/Tait/108.pdf>. El procedimiento descrito es muy similar a la metodología propuesta por Kumar. El procedimiento expresa la anexina A5 en células huésped recombinantes de *E. Coli* en cultivos de 1 L, sedimentando las células, resuspendiendo las células en presencia de un tampón de homogeneización/lisis consistente en 50 mM de Tris HCl, 10 mM de CaCl<sub>2</sub> a pH 7,2 y luego rompiendo las células por sonicación para liberar la proteína anexina A5. La adición de CaCl<sub>2</sub> hace que la anexina A5 se una, en función del calcio, a las membranas celulares de los residuos, y luego la mezcla se somete a una primera etapa de centrifugación de purificación de 20 minutos, tras lo cual se desecha el sobrenadante y se recupera el sedimento que contiene los residuos celulares y la anexina A5 unida. La anexina A5 se liberó del sedimento usando EDTA, y a esto siguió una segunda etapa de centrifugación de purificación de 20 minutos y la recolección de la anexina A5 en el sobrenadante. Luego siguió una etapa de diálisis para cambiar el tampón de anexina A5 a Tris HCl a pH 8,0, antes de la etapa adicional de intercambio aniónico en una columna de Mono Q, y la

elución de la anexina A5 usando un gradiente de sal. El presente solicitante se ha dado cuenta de que las numerosas limitaciones y deficiencias del procedimiento de Kumar también se aplican a este procedimiento.

En 2014, se propuso otro procedimiento para la purificación de la anexina A5 en Marder y col. 2014, BMC Biotechnology, 14:33, titulado "*Production of recombinant human annexin V by fed-batch cultivation*". Marder y col. informan de que su procedimiento es un procedimiento de alimentación por lotes para producir a gran escala anexina V humana recombinante, y se propone que este procedimiento pueda expandir las utilidades comerciales para la anexina A5 humana recombinante a aplicaciones tales como estudios de imágenes *in vivo*.

Una vez más, el procedimiento de Marder y col. es muy similar al procedimiento de 1991 de Kumar y al procedimiento de 2008 del Departamento de Medicina de Laboratorio del Centro Médico de la Universidad de Washington. Marder y col. expresan la anexina A5 en células huésped recombinantes de *E.coli* en cultivos de 1 L, almacenados en tanques de 2 L. Como se ha explicado (en la sección Purificación de los Procedimientos de Marder y col.), las células recolectadas se resuspendieron en presencia de un tampón de homogeneización/lisis (tampón A) consistente en 50 mM de Tris HCl, 10 mM de CaCl<sub>2</sub> a pH 7,2, y luego se rompieron las células por sonicación para liberar la proteína anexina A5. La adición de CaCl<sub>2</sub> hace que la anexina A5 se una, en función del calcio, a las membranas celulares de los residuos, y luego la mezcla se somete a una primera etapa de centrifugación de purificación de 30 minutos, tras lo cual se desecha el sobrenadante y se recupera el sedimento que contiene los residuos celulares y la anexina A5 unida. La anexina A5 se liberó del sedimento usando EDTA, y a esto siguió una segunda etapa de centrifugación de purificación de 30 minutos y la recolección de la anexina A5 en el sobrenadante. Luego siguió un paso de diálisis para cambiar el tampón de anexina A5 a Tris HCl a pH 8,0, antes de una tercera etapa de centrifugación de purificación de 20 minutos para eliminar el precipitado residual y luego una etapa adicional de intercambio aniónico en una columna de Mono Q, y la elución de la anexina A5 utilizando un gradiente de sal. Una vez más, el presente solicitante se ha dado cuenta de que las numerosas limitaciones y deficiencias del procedimiento de Kumar también se aplican a este procedimiento.

El procedimiento de 1997 de Kumar, el procedimiento de 2008 del Departamento de Medicina de Laboratorio del Centro Médico de la Universidad de Washington y el procedimiento de 2014 de Marder y col. muestran claramente que la técnica había desarrollado y establecido un enfoque para la producción y purificación de productos de anexina A5 para fines comerciales, aunque las limitaciones y las deficiencias de tales procedimientos no fueron apreciados en la técnica, sin una alternativa fácilmente disponible.

Todos estos procedimientos de la técnica anterior para la recuperación de anexina A5 se han demostrado solo en un procedimiento a escala de laboratorio y no son incapaces de ser usados para la ampliación o consideración de las normas de la industria o los equipos disponibles a mayor escala. Los procedimientos tienen inconvenientes inherentes que los hacen inadecuados para la fabricación a gran escala. En particular, las características altamente limitantes de estos procedimientos de la técnica anterior son las dos o (en el caso del procedimiento de 2014 de Marder y col.) las tres centrifugaciones a altas fuerzas G que requieren los procedimientos cuando la anexina A5 se encuentra de forma alternativa en solución o como precipitado. Se puede estimar de manera razonable que la aplicación de solo dos etapas de centrifugación al procesamiento de un lote de 1000 L resultará en un procedimiento que duraría aproximadamente 12 semanas con turnos diarios de 12 horas en cualquier planta de biofabricación bien equipada, lo que generaría costes de producción inaceptablemente altos. Véase el Ejemplo Comparativo 1.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar etapas metodológicas para la purificación y recuperación de anexina A5 que sean eficaces y rentables para un procedimiento de fabricación que funcione a escala comercial (por ejemplo, cultivos de células huésped recombinantes con un volumen de cultivo de aproximadamente 1000 L o más) y, además, superar los inconvenientes de la pérdida de rendimiento y de la baja pureza (incluida la contaminación por endotoxinas) sufridos por los procedimientos de la técnica anterior.

También es un objeto de la invención proporcionar productos de anexina A5 de grado farmacéutico producidos mediante los procedimientos de la presente invención.

### **Sumario de la invención**

El solicitante ha realizado numerosos desarrollos y mejoras de un procedimiento para la producción de una proteína que comprende la secuencia de anexina A5 (AnxA5), y ha ideado varias etapas de purificación altamente eficaces, que pueden usarse de manera independiente y/o en combinación para mejorar los procedimientos existentes. Más preferentemente, el procedimiento para la producción de anexina A5 contiene todas las etapas del procedimiento desarrollado.

En particular, los desarrollos del solicitante ofrecen la posibilidad de un procedimiento altamente eficaz para la recuperación de la proteína AnxA5 mediante un procedimiento en el que la proteína AnxA5 preferentemente permanece en solución durante todo el procedimiento (excepto cuando se une temporalmente a resinas cromatográficas). Es decir, los desarrollos del solicitante proporcionan un procedimiento para la recuperación de la proteína AnxA5 que puede realizarse preferentemente sin necesidad de aplicar ninguna etapa de centrifugación de purificación a la proteína AnxA5 tras la liberación de la proteína AnxA5 de una célula huésped. Esto tiene un enorme beneficio industrial, ya que las centrifugaciones a altas fuerzas G para recoger precipitados son difíciles, lentas y

costosas de aplicar en plantas de fabricación biofarmacéutica a gran escala. Además, esto significa que todos los procedimientos de la presente invención pueden realizarse sin depender de la capacidad de la anexina A5 para unirse a las membranas (por ejemplo, membranas de células huésped y/o liposomas) que a menudo pueden hacer que la anexina A5 se purifique conjuntamente con contaminantes indeseables como las endotoxinas.

- 5 Por consiguiente, el procedimiento puede aplicarse al procesamiento de cultivos de gran volumen (por ejemplo, aproximadamente 100 L, 500 L, 1.000 L, 5.000 L, 10.000 L, 50.000 L, 100.000 L o más) de células huésped en un tiempo altamente eficaz, sin el cuello de botella causado por una o más etapas de centrifugación de purificación. Por ejemplo, puede ser preferible que el procedimiento de purificación se lleve a cabo en, o en menos de, 5, 4, 3, 2 semanas y, por lo general, en menos de 1 semana por 1.000 L de cultivo de células huésped procesadas. Es más, el procedimiento se puede usar, sorprendentemente, para proporcionar un rendimiento mejorado y/o una pureza mejorada (incluyendo, por ejemplo, una mejor eliminación de endotoxinas) en comparación con los procedimientos más lentos y menos eficaces de la técnica anterior.

- 15 Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención proporciona una etapa de liberación de proteínas de una célula huésped mejorada. Más específicamente, proporciona un procedimiento para la recuperación y/o purificación de una proteína intracelular expresada de forma recombinante que comprende la secuencia de anexina A5 (AnxA5) a partir de una célula huésped productora de endotoxinas con pared celular, comprendiendo el procedimiento la liberación de la proteína intracelular de la célula huésped, caracterizado porque la etapa de liberación de la proteína AnxA5 intracelular se realiza en presencia de un tampón de homogeneización que comprende un detergente no iónico. De preferencia, el detergente no iónico es un polisorbato, más preferentemente un polisorbato seleccionado entre Tween20 y Tween80, y más preferentemente Tween80.

- 25 El solicitante también ha descubierto (tal como se explica más adelante en el Ejemplo 2, a continuación), contrariamente a los procedimientos convencionales en los que la adición sucesiva de etapas de purificación conduce a una pérdida de rendimiento cada vez mayor (ya que el producto se pierde en cada etapa), que la combinación de una etapa de intercambio aniónico y una etapa de cromatografía de afinidad de heparina tiene el sorprendente beneficio de alcanzar la alta pureza alcanzada por la etapa de cromatografía de afinidad de heparina sola, pero con un rendimiento sustancialmente mayor (es decir, la recuperación se incrementa de aproximadamente un 30-40 % a aproximadamente un 70-90 %). Esto es lo contrario de lo que normalmente cabría esperar de la combinación de etapas de purificación.

- 30 Por consiguiente, un procedimiento de acuerdo con una primera realización preferida del primer aspecto de la presente invención puede incluir un procedimiento para la recuperación y/o purificación de la proteína que comprende la secuencia de anexina A5 (AnxA5), a partir de una solución que comprende la proteína AnxA5 y una o más impurezas, comprendiendo el procedimiento

- 35 someter la solución que comprende la proteína AnxA5 y una o más impurezas a una resina de intercambio aniónico para realizar una primera etapa de intercambio aniónico, y así producir un primer producto de intercambio aniónico que comprenda la proteína AnxA5 liberada; y someter el primer producto de intercambio aniónico, directa o indirectamente, a una etapa de cromatografía de afinidad, para producir así un primer producto de cromatografía de afinidad que comprenda la proteína AnxA5 liberada.

- 40 De preferencia, de acuerdo con el procedimiento de la primera realización, la etapa de cromatografía de afinidad puede comprender la unión de la proteína AnxA5 a heparina inmovilizada, y opcionalmente en la que la unión es promovida por la presencia de iones de calcio y, además, opcionalmente, la proteína AnxA5 se eluye de la heparina inmovilizada utilizando un tampón de elución que contiene un quelante de iones de calcio, tal como el EDTA.

- 45 Además, como se explica en el Ejemplo 3, el solicitante ha descubierto que Tween80 tiene un efecto particularmente ventajoso (en comparación con otros detergentes no iónicos, incluyendo otros Tweens, como Tween20) en una etapa de cromatografía de afinidad de heparina. La inclusión de Tween 80, por ejemplo, en torno al 0,1 % (p/v) en los tampones utilizados en la etapa de cromatografía de afinidad de heparina puede ayudar a eluir la proteína AnxA5 en un solo pico, reducir la presión y prevenir la precipitación.

- 50 Por consiguiente, un procedimiento de acuerdo con una segunda realización preferida del primer aspecto de la presente invención puede incluir un procedimiento para la recuperación y/o purificación de la proteína que comprende la secuencia de anexina A5 (AnxA5), a partir de una solución que comprende la proteína AnxA5 y una o más impurezas, comprendiendo el procedimiento someter la solución que comprende la proteína AnxA5 y una o más impurezas (que pueden ser el producto directo o indirecto de una primera etapa de captura por cromatografía de intercambio aniónico, como se explica en el presente documento) a una etapa de cromatografía de afinidad de heparina en presencia de Tween80 (de preferencia, en presencia de aproximadamente 0,1 % p/v de Tween80), para producir así un primer producto de cromatografía de afinidad que comprende la proteína AnxA5 liberada.

- 55 Un procedimiento de acuerdo con una tercera realización preferida del primer aspecto de la presente invención se basa en la comprensión por parte del solicitante de que los quelantes de iones metálicos de calcio (por ejemplo, EDTA) pueden tener un impacto negativo en la eficacia de las etapas de intercambio aniónico. El EDTA libre (u otro

quelante) puede unirse directamente a los grupos funcionales de intercambio aniónico, y, por lo tanto, reducir la capacidad y también la separación lograda por una etapa de intercambio aniónico. Por otro lado, tratar de eliminar el quelante de iones metálicos de calcio antes de una etapa de intercambio aniónico requiere mucho tiempo y, por lo tanto, también aumenta los costes. Por lo tanto, los procedimientos de la técnica anterior que implican etapas de diálisis lentas para la sustitución del tampón son ineficaces. Además, la inclusión del quelante de iones metálicos de calcio en el producto AnxA5 durante la etapa de intercambio aniónico puede ser un componente importante para prevenir la unión mediada por calcio de la proteína AnxA5 a las impurezas, incluyendo la endotoxina. Por lo tanto, sería conveniente y eficaz introducir un aditivo que bloquee o reduzca la unión del quelante de iones de calcio a la resina de intercambio aniónico, lo que permitiría que la etapa de intercambio aniónico se realizara sin los inconvenientes ni los costes asociados a la diálisis, y sin evitar el efecto beneficioso del quelante de iones metálicos de calcio durante la etapa de intercambio aniónico.

El solicitante se ha dado cuenta de que esto puede lograrse mediante la inclusión en el producto de proteína AnxA5, antes del intercambio aniónico, de uno o más tipos de iones metálicos seleccionados adicionales, en la que los iones metálicos seleccionados adicionales se seleccionan de manera tal que el quelante de iones metálicos de calcio tiene una afinidad de unión con los iones metálicos seleccionados que es mayor que su afinidad de unión con la resina de intercambio aniónico, pero menor que su afinidad de unión con los iones de calcio. La selección de los iones metálicos adicionales apropiados dependerá de la naturaleza del quelante de iones de calcio y de la naturaleza de la resina de intercambio aniónico. Por ejemplo, en el caso de usar EDTA como quelante de iones de calcio, los iones  $Mg^{2+}$  son generalmente adecuados para lograr el objetivo de la presente invención, y se pueden agregar al producto de proteína AnxA5 antes de una etapa de intercambio aniónico.

Por consiguiente, la tercera realización preferida del primer aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para la recuperación y/o purificación de la proteína que comprende la secuencia de anexina A5 (AnxA5) a partir de una composición que comprende la proteína AnxA5 y un quelante de iones metálicos de calcio,

caracterizado porque el procedimiento comprende someter la composición a una resina de intercambio aniónico para realizar una etapa de intercambio aniónico y así recuperar y/o purificar la proteína AnxA5 de la composición, y además, caracterizado porque la etapa de intercambio aniónico se realiza en presencia de iones metálicos seleccionados adicionales, en el que los iones metálicos seleccionados adicionales se seleccionan de manera que el quelante de iones metálicos de calcio tenga una afinidad de unión con los iones metálicos seleccionados que sea mayor que su afinidad de unión con la resina de intercambio aniónico, pero menor que su afinidad de unión con los iones de calcio.

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona una composición que comprende una proteína AnxA5 tal como se define adicionalmente en la reivindicación 18. Opcionalmente, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable y/o veterinariamente aceptable.

El tercer aspecto de la presente invención también proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para su uso en medicina. Para decirlo de otra manera, la presente solicitud describe un procedimiento que comprende administrar a un ser humano o animal que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición del segundo aspecto de la presente invención.

Se contempla que cualquier procedimiento o composición descrita en el presente documento pueda implementarse con respecto a cualquier otro procedimiento o cualquier otra composición descrita en el presente documento.

Los términos “un” o “una” cuando se usan junto con la expresión “que comprende” en las reivindicaciones y/o en la especificación pueden significar “uno” o “una”, pero también son coherentes con el significado de “uno o más”, “una o más”, “al menos uno”, “al menos una”, “uno o más de uno” y “una o más de una”.

Estos y otros aspectos de la presente invención se apreciarán y entenderán mejor cuando se consideren en conjunto con la siguiente descripción y los dibujos adjuntos. Sin embargo, debe entenderse que la siguiente descripción, si bien indica varios aspectos y realizaciones de la invención y numerosos detalles específicos de la misma, se proporciona a modo de ilustración.

#### **descripción de las figuras**

La **Figura 1** muestra la secuencia SEQ ID NO: 1, que es la secuencia de la anexina A5 humana.

La **Figura 2** muestra un diagrama de flujo esquemático del procedimiento completo de fabricación ejemplificado de la anexina A5.

La **Figura 3** proporciona un diagrama de flujo del procedimiento para la cromatografía de captura AX ejemplificada.

La **Figura 4** muestra el diagrama de flujo del procedimiento para la cromatografía de afinidad intermedia ejemplificada.

La **Figura 5** muestra el diagrama de flujo del procedimiento para la etapa de cromatografía de pulido AX ejemplificada.

La **Figura 6** muestra el diagrama de flujo del procedimiento para ejemplificación de ultra/diafiltración y formulación de anexina A5.

- 5 La **Figura 7** muestra los resultados del Ejemplo 3, que demuestra el impacto de Tween80 en la purificación por cromatografía de afinidad con heparina de la anexina A5, en donde la Figura 7A muestra los resultados para la Prueba 1 (sin Tween80), y la Figura 7B muestra los resultados para la Prueba 2 (con Tween80).

### **Descripción detallada de la invención**

#### **A. Proteína anexina A5**

- 10 La presente invención se refiere a procedimientos para la purificación y/o recuperación de una proteína que comprende la secuencia de anexina A5 (AnxA5), y a productos y formulaciones así producidos que comprenden la proteína AnxA5.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la proteína AnxA5 que se purifica y/o recupera puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, una proteína que tiene la secuencia de la anexina A5 humana (SEQ ID NO: 1, como se muestra en la Figura 1), con o sin la metionina N-terminal.

15 En otra realización, la proteína AnxA5 que se purifica y/o recupera puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, una variante o mutante de una proteína que tiene la secuencia de la anexina A5 humana (SEQ ID NO:1, como se muestra en la Figura 1), con o sin la metionina N-terminal. Por ejemplo, la variante o mutante puede diferir de la SEQ ID NO:1 (con o sin la metionina N-terminal) en una o más posiciones, como en, o hasta, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 o más posiciones.

20 Por lo tanto, una variante o mutante de anexina A5 puede ser una proteína en la que en una o más posiciones ha habido inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, bien conservativas o bien no conservativas. De preferencia, los cambios dan como resultado una proteína cuyas propiedades básicas para funcionar de manera equivalente a la anexina A5 no se han modificado significativamente. "Significativamente" en este contexto significa que un experto en la materia diría que las propiedades de la variante pueden seguir siendo diferentes, pero serían obvias con respecto a las de la proteína original.

Preferentemente, el punto isoeléctrico (pi) de la variante o mutante no se altera, en comparación con la proteína no modificada, o no se modifica en más de 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 unidades de pH.

- 30 En una realización preferida, la proteína AnxA5 es capaz de unirse a fosfatidilserina en una membrana biológica, preferentemente a un nivel que es al menos del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o aproximadamente el 100 % del presentado por la anexina A5 humana (SEQ ID NO:1) en las mismas condiciones. Se conoce en la técnica un procedimiento adecuado para medir la unión de anexina A5 a fosfatidilserina en una membrana biológica (Vermes y col. (1995) J Immunol Methods, 184(1): p. 39-51).

- 35 Por "sustituciones conservativas" quiere decirse combinaciones tales como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr.

Se pueden preparar variantes y mutantes usando los procedimientos de ingeniería de proteínas y mutagénesis dirigida al sitio que se conocen bien en la técnica.

- 40 En una realización adicional, la proteína AnxA5 que se purifica y/o recupera puede ser un dímero de una proteína que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una proteína que tiene la secuencia de la anexina A5 humana (SEQ ID NO:1, como se muestra en la Figura 1), con o sin la metionina N-terminal, o una variante o mutante de la misma tal como se describió anteriormente.

45 En una realización adicional, la proteína AnxA5 que se purifica y/o recupera puede ser una proteína de fusión, que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en: (a) una o más secuencias de proteínas que comprenden la secuencia de la pareja de fusión a la que está/están fusionados a; (b) una o más secuencias de proteínas que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, una proteína que tiene la secuencia de la anexina A5 humana (SEQ ID NO:1, como se muestra en la Figura 1), con o sin la metionina N-terminal, o una variante o mutante de la misma, o un dímero, tal como se describe anteriormente. Por ejemplo, sin limitación, la proteína de fusión puede tener una estructura general seleccionada de:

- 50 - en el caso de la fusión de dos secuencias de aminoácidos, por ejemplo: H<sub>2</sub>N-(a)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(a)-COOH; o  
 - en el caso de la fusión de tres secuencias de aminoácidos, por ejemplo: H<sub>2</sub>N-(a)-(b)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(a)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(b)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(b)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(a)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(a)-(a)-COOH; o  
 - en el caso de la fusión de cuatro secuencias de aminoácidos, por ejemplo: H<sub>2</sub>N-(a)-(a)-(a)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-

(a)-(b)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(b)-(a)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(a)-(a)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(a)-(b)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(b)-(a)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(a)-(a)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(b)-(b)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(a)-(b)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(b)-(a)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(b)-(b)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(b)-(a)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(a)-(b)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(b)-(b)-(b)-COOH; o

- 5 - en el caso de la fusión de cinco secuencias de aminoácidos, por ejemplo: o H<sub>2</sub>N-(a)-(a)-(a)-(a)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(a)-(a)-(b)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(a)-(b)-(a)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(a)-(b)-(a)-(aHa)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(a)-(a)-(a)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(a)-(a)-(b)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(a)-(b)-(a)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(b)-(a)-(a)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(a)-(a)-(a)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(a)-(b)-(b)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(b)-(a)-(b)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(a)-(a)-(b)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(b)-(b)-(a)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(a)-(b)-(a)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(b)-(a)-(a)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(a)-(b)-(b)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(b)-(a)-(b)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(a)-(a)-(b)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(b)-(b)-(a)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(a)-(b)-(b)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(b)-(b)-(a)-(a)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(a)-(b)-(b)-(b)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(a)-(b)-(b)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(b)-(a)-(b)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(b)-(b)-(a)-(b)-COOH; o H<sub>2</sub>N-(b)-(b)-(b)-(b)-(a)-COOH,

- 15 en la que (a) y (b) son como se definen anteriormente en este párrafo. En el caso de múltiples proteínas asociadas a la fusión, tal como se definen en (a), las múltiples parejas de fusión pueden ser iguales o diferentes. Se puede utilizar cualquier pareja de fusión de interés. Por ejemplo, la secuencia o secuencias polipeptídicas de la pareja de fusión pueden ser adecuadas para prolongar la semivida de la molécula dentro del sistema circulatorio de un paciente y/o añadir funcionalidad adicional a la molécula, como para añadir propiedades terapéuticas adicionales (por ejemplo, anticoagulante, inhibición y/o destrucción de células, etc.). En el caso de proteínas de fusión que comprenden múltiples secuencias de proteínas que tienen la secuencia de la anexina A5 humana (SEQ ID NO:1, como se muestra en la Figura 1), con o sin la metionina N-terminal, o una variante o mutante de la misma, o un dímero como se describió anteriormente, como se define en (b), esas proteínas pueden ser iguales o diferentes.

- 20 De acuerdo con una realización adicional de la presente invención, la proteína AnxA5 que se purifica y/o recupera puede ser una proteína que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, la secuencia de anexina A5 o una variante funcional o mutante de la misma según seleccionada de:

- 25 a) anexina A5 humana (SEQ ID NO:1), con o sin la metionina N-terminal;  
 b) un ortólogo de mamífero de anexina A5 humana;  
 c) una variante alélica o genética de a) o b);  
 30 d) una proteína que es idéntica en más del 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, tal como en más del 80 %, 85 %, en más del 90 %, o incluso más preferentemente en más del 95 % o 99 % a cualquiera de a), b) o c);  
 e) un dímero de cualquiera de a), b), c) o d); o  
 f) una proteína de fusión que comprende una o más parejas de fusión fusionadas con cualquiera de a), b), c), d) o e).

- 35 En realizaciones particulares, la proteína AnxA5 es una variante funcional o mutante de la anexina A5 que es idéntica en más del 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, tal como en más del 80 %, 85 %, en más del 90 %, o incluso más preferentemente en más del 95 % o 99 % a la anexina A5 humana, SEQ ID NO:1, con o sin la metionina N-terminal.

- 40 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina de la siguiente manera. En primer lugar, se compara una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, con SEQ ID NO:1 usando el programa BLAST 2 Sequences (BI2seq) de la versión independiente de BLASTZ que contiene la versión de BLASTN 2.0.14 y la versión de BLASTP 2.0.14. Esta versión independiente de BLASTZ se puede obtener del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica del gobierno de los Estados Unidos en ncbi.nlm.nih.gov. Pueden encontrarse instrucciones que explican cómo usar el programa BI2seq en el archivo "léame" que acompaña a BLASTZ. BI2seq realiza una comparación entre dos secuencias de aminoácidos usando el algoritmo BLASTP. Para comparar dos secuencias de aminoácidos, las opciones de BI2seq se fijan de la siguiente manera: -i se fija a un archivo que contiene la primera secuencia de aminoácidos que se va a comparar (por ejemplo, C:\seq1.txt); -j se fija a un archivo que contiene la segunda secuencia de aminoácidos que se va a comparar (por ejemplo, C:\seq2.txt); -p se fija a blastp; -o se fija a cualquier nombre de archivo deseado (por ejemplo, C:\output.txt); y todas las demás opciones se dejan en su configuración predeterminada. Por ejemplo, puede usarse el siguiente comando para generar un archivo de salida que contenga una comparación entre dos secuencias de aminoácidos: C:\BI2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt. Si las dos secuencias comparadas comparten homología, entonces el archivo de salida designado presentará esas regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos secuencias comparadas no comparten homología, el archivo de salida designado no presentará secuencias alineadas. Una vez alineadas, se determina el número de coincidencias contando el número de posiciones en las que está presente un residuo de nucleótido o aminoácido idéntico en ambas secuencias.

- 55 El porcentaje de identidad se determina dividiendo el número de coincidencias entre la longitud de la secuencia establecida en una secuencia identificada, seguido de la multiplicación del valor resultante por 100. Por ejemplo, si se compara una secuencia con la secuencia establecida en SEQ ID NO:1 (la longitud de la secuencia establecida en SEQ ID NO:1 es de 320) y el número de coincidencias es 288, entonces la secuencia tiene un porcentaje de identidad de 90 (es decir,  $288 \div 320 * 100 = 90$ ) con la secuencia establecida en SEQ ID NO:1.

- 60 La proteína AnxA5 puede ser un dímero de anexina A5 (tal como la dianexina) o una variante funcional o mutante de



la misma. La dianexina A5 se describe en el documento WO 02/067857.

Preferentemente, la proteína AnxA5 no incluye una etiqueta His, y su recuperación y purificación no se logra usando una etapa de unión por afinidad a una secuencia de la etiqueta His.

Una etiqueta His es un motivo de aminoácidos de polihistidina en proteínas que generalmente consiste en al menos seis residuos de histidina (His), y con frecuencia (aunque no necesariamente) en el extremo N o C de la proteína. Las etiquetas de polihistidina se usan a menudo para la purificación por afinidad de proteínas recombinantes etiquetadas con polihistidina expresadas en *Escherichia coli* y otros sistemas de expresión procariotas, mediante incubación con una resina de afinidad que contiene iones de níquel o cobalto bivalentes unidos, que están disponibles comercialmente en diferentes variedades. Estas resinas son generalmente sefrosa/agarosa funcionalizada con un quelante, como el ácido iminodiacético (Ni-IDA) y el ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) para el níquel y carboximetilaspártato (Co-CMA) para el cobalto, que la etiqueta de polihistidina une con afinidad micromolar. La resina luego se lava generalmente con tampón fosfato para eliminar las proteínas que no interactúan específicamente con el ion cobalto o níquel. Con los procedimientos basados en Ni, la eficacia del lavado puede mejorarse mediante la adición de 20 mM de imidazol (las proteínas generalmente se eluyen con 150-300 mM de imidazol).

Aunque el enfoque de la etiqueta His es conveniente para la purificación, la presencia de motivos de polihistidina no nativos en proteínas terapéuticas, incluida la proteína AnxA5, es indeseable, ya que puede provocar reacciones adversas en el paciente, tales como respuestas inmunológicas. Por otra parte, intentar eliminar los motivos de las etiquetas His después de la producción de proteínas es laborioso, lento y costoso y, en la práctica, las preparaciones de proteínas de las que se hayan eliminado las etiquetas His normalmente retendrán uno o más residuos de histidina ajenos.

En consecuencia, preferentemente, la proteína AnxA5 no incluye una etiqueta His, y su recuperación y purificación no se logra utilizando una etapa de unión por afinidad a una secuencia de la etiqueta His.

La proteína AnxA5 de la presente invención puede ser o no (preferentemente, no lo es), una variante de una variante o mutante de una proteína que tiene la secuencia de la anexina A5 humana que se modifica para comprender uno o más, tal como como hasta veinte, motivos RGD (arginina-glicina-aspartato), tal como se describe en el documento WO 2010/140886. Como se describe en el documento WO 2010/140886, la adición de uno o más motivos RGD se puede usar para mejorar la fagocitosis mediante el uso de variantes de AnxA5 que se unen a la fosfatidilserina (PS) en las células apoptóticas y activan los fagocitos para engullir a las células apoptóticas en lugar de inhibir la fagocitosis.

## B. Cultivo de células huésped

La proteína AnxA5 puede expresarse de forma recombinante en un cultivo de células huésped. Los cultivos de células huésped preferidos que expresan la proteína AnxA5, de acuerdo con la presente invención, son cultivos que se encuentran a escala comercial para la producción de la proteína AnxA5, tales como cultivos que tienen un volumen de cultivo de aproximadamente 100 L, aproximadamente 200 L, aproximadamente 300 L, aproximadamente 400 L, aproximadamente 500 L, aproximadamente 600 L, aproximadamente 700 L, aproximadamente 800 L, aproximadamente 900 L, aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 7.0000 L, aproximadamente 8.0000 L, aproximadamente 9.0000 L, aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 30.000 L, aproximadamente 40.000 L, aproximadamente 50.000 L, aproximadamente 60.000 L, aproximadamente 70.0000 L, aproximadamente 80.0000 L, aproximadamente 90.0000 L, aproximadamente 100.000 L o más. El término "aproximadamente" en ese contexto puede incluir el significado de  $\pm$  50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % del volumen indicado.

Los procedimientos para la expresión recombinante de un gen de interés son muy conocidos en la técnica.

Generalmente, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AnxA5 se expresará de forma recombinante en un cultivo de células huésped. Por ejemplo, la secuencia que codifica la proteína AnxA5 puede introducirse en una célula huésped mediante la transformación de la célula huésped con un plásmido u otro vector que comprende la secuencia que codifica la proteína AnxA5 y, opcionalmente, la secuencia que codifica la proteína AnxA5 se integrará en el cromosoma (o plastoma) de la célula huésped o se mantendrá en un vector extracromosómico replicable.

Por consiguiente, una célula huésped puede transformarse con un constructo vectorial de polinucleótidos que comprende una secuencia que codifica la proteína AnxA5.

La célula huésped puede ser procariótica o eucariótica.

Las células bacterianas son células huésped procarióticas preferidas en el contexto de la presente invención. Las células huésped bacterianas pueden ser, por ejemplo, células huésped grampositivas o gramnegativas (aunque también se pueden usar bacterias gramneutrales y grampositivas). Ejemplos de bacterias gramnegativas incluyen,

pero no se limitan a, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* y *Vibrio cholera*.

Al menos en el contexto del primer aspecto de la presente invención, y opcionalmente en el contexto de todos los aspectos de la presente invención, la célula huésped es una célula huésped productora de endotoxinas con una pared celular, y por lo tanto es típicamente una bacteria gramnegativas como la *E. coli*, por ejemplo, las cepas de E. DH5 disponibles en Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EE. UU., y RR1 disponibles en American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EE. UU. (No ATCC 31343).

Para evitar dudas, el término "célula huésped productora de endotoxina con una pared celular" puede interpretarse como una exclusión de la levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, y otras células eucariotas.

Otra cepa de *E. coli* productora de endotoxinas particularmente preferida incluye la cepa BL21 (DE3) (por ejemplo, la que está ampliamente disponible en comercio y la descrita en Marder y col., 2014, BMC Biotechnology, 14:33). Sin embargo, el solicitante ha descubierto que la anexina A5 expresada a partir de la cepa BL21 (DE3) muestra sorprendentemente altos niveles inesperados de gluconoilación postraducciona no deseables, de modo que aproximadamente el 40 % de la proteína anexina A5 estaba gluconoilada. Se trata de un nivel mucho más alto que el nivel de gluconoilación de la mayoría de las otras proteínas expresadas de forma recombinante en BL21 (DE3), que por lo general muestran niveles de gluconoilación de aproximadamente solo 5-10 %. Por lo tanto, es aún más preferible que la cepa de *E. coli* productora de endotoxinas sea una cepa de BL21 (DE3) que está diseñada para reducir el nivel de gluconoilación de la proteína AnxA5, por ejemplo, mediante la sobreexpresión de fosfogluconolactonasa (PGL), tal como se describe en Aon y col. (Appl. Env. Microbiol., 2008, 74(4): 950-958) y que, por lo tanto, suprime la gluconoilación postraducciona de la proteína expresada de forma recombinante, suprimiendo así la formación de variantes gluconoiladas de la proteína AnxA5 a un nivel inferior al 40 %, tales como inferiores al 30 %, 20 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %, y, de preferencia, sustancialmente 0 %.

Generalmente, la célula huésped bacteriana para uso en la presente invención es una célula huésped bacteriana con una pared, y, por lo tanto, preferentemente se excluyen las células que carecen de una pared celular y (en el caso de bacterias gramnegativas) de la membrana externa, tal como un esferoplasto (según se describe en Liu y col., 2006, J. Exp. Microbiol., 9: 81-85). Los esferoplastos, dentro del contexto de la presente solicitud, no son células huésped productoras de endotoxinas y no tienen una pared celular. Los esferoplastos son totalmente inadecuados para la producción a escala comercial, en particular debido a su sensibilidad y fragilidad en ausencia de una pared celular, lo que restringe enormemente su capacidad para crecer productivamente en cultivos de gran volumen.

Opcionalmente, la célula huésped es una célula huésped productora de endotoxinas con una pared celular que es incapaz de ser lisada por choque osmótico y/o tratamientos de congelación/descongelación.

En otra opción adicional, el cultivo de células huésped es un cultivo en el que la célula huésped no se cultiva, o no se ha cultivado, en presencia de un antibiótico al que no tiene resistencia y, opcionalmente, en presencia de ningún antibiótico. Los antibióticos específicos que deben evitarse, en una opción, son los antibióticos que dan lugar a la formación de esferoplastos, como la ampicilina.

Las células huésped eucariotas pueden incluir células de levadura y de mamíferos, preferentemente células de vertebrados, tales como las de las líneas celulares fibroblásticas de ratón, rata, mono o humanas. Las células huésped de levadura incluyen YPH499, YPH500 e YPH501, normalmente disponibles en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE. UU. Las células huésped de mamíferos preferidas incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles en la ATCC como CCL61, células NIH/3T3 embrionarias de ratón NIH suizo disponibles en la ATCC como CRL 1658, y células COS-1 procedentes del riñón de mono disponibles en la ATCC como CRL 1650. Las células de insecto preferidas son las células Sf9 que pueden ser transfectadas con vectores de expresión de baculovirus.

Plásmidos de vector procariótico típicos son: pUC18, pUC19, pBR322 y pBR329 disponibles en Biorad Laboratories (Richmond, CA, EE. UU.); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 y pRIT5 disponibles en Pharmacia (Piscataway, NJ, EE. UU.); Vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A disponibles en Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, EE. UU.).

Un plásmido de vector de células de mamífero típico es pSVL, disponible en Pharmacia (Piscataway, NJ, EE. UU.). Este vector utiliza el promotor tardío SV40 para dirigir la expresión de genes clonados, encontrándose el nivel más alto de expresión en las células productoras de antígeno T, como las células COS-1. Un ejemplo de un vector de expresión de mamífero inducible es pMSG, también disponible en Pharmacia (Piscataway, NJ, EE. UU.). Este vector utiliza el promotor inducible por glucocorticoides de la repetición terminal larga del virus del tumor mamario de ratón para dirigir la expresión del gen clonado.

Los vectores de plásmidos de levadura útiles son pRS403-406 y pRS413-416 y están generalmente disponibles en Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, EE. UU.). Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos de integración de levadura (Yips) e incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3,

TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos de centrómero de levadura (YCps).

Se pueden usar procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contengan la secuencia codificante de la proteína AnxA5 como, por ejemplo, controles transcripcionales o traduccionales apropiados. Uno de estos procedimientos implica la ligadura mediante colas de homopolímeros. Se añaden colas de homopolímero polydA (o polydC) a grupos 3' OH expuestos sobre el fragmento de ADN para ser clonado por desoxinucleotidil transferasa terminal. El fragmento es entonces capaz de hibridar con las colas polydT (o polydG) añadidas a los extremos de un vector de plásmido linealizado. Los huecos que quedan después de la hibridación pueden llenarse con la ADN polimerasa y los extremos libres unidos por la ADN ligasa.

Otro procedimiento implica la ligadura mediante de extremos cohesivos. Se pueden generar extremos cohesivos compatibles sobre el fragmento de ADN y el vector por la acción de enzimas de restricción adecuadas. Estos extremos se hibridarán rápidamente a través del emparejamiento complementario de bases y las mellas restantes se pueden cerrar mediante la acción de la ADN ligasa.

Un procedimiento adicional utiliza moléculas sintéticas llamadas enlazadores y adaptadores. Los fragmentos de ADN con extremos romos son generados por el bacteriófago T4 ADN polimerasa o *E. coli* ADN polimerasa I que eliminan los extremos 3' que sobresalen y rellenan los extremos 3' empotrados. Los ligantes sintéticos, fragmentos de ADN bicatenario con extremos romos que contienen secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción definidas, pueden ligarse a fragmentos de ADN con extremos romos mediante la ADN ligasa T4. Posteriormente, se digieren con enzimas de restricción apropiadas para crear extremos cohesivos y se ligan a un vector de expresión con extremos compatibles. Los adaptadores también son fragmentos de ADN sintetizados químicamente que contienen un extremo romo utilizado para la ligadura, pero que también poseen un extremo cohesivo preformado.

Los enlazadores sintéticos que contienen una variedad de sitios de endonucleasas de restricción están disponibles comercialmente de varias fuentes, que incluyen International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, EE. UU.

Una forma deseable de modificar el ADN que codifica la proteína AnxA5 es usar la reacción en cadena de la polimerasa como se describe en Saiki y col. (1988) *Science* 239, 487-491. En este procedimiento, el ADN que se va a amplificar enzimáticamente está flanqueado por dos cebadores oligonucleotídicos específicos que se incorporan al ADN amplificado. Dichos cebadores específicos pueden contener sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que pueden usarse para la clonación en vectores de expresión utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

La transformación de los huéspedes celulares apropiados con un constructo de ADN que comprende una secuencia que codifica la proteína AnxA5 se realiza mediante procedimientos bien conocidos que dependen generalmente del tipo de vector utilizado.

Con respecto a la transformación de células huésped procarióticas, véase, por ejemplo, Cohen y col. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110 y Sambrook y col. (2001) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. La transformación de células de levadura se describe en Sherman y col. (1986) *Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY. The method of Beggs (1978) *Nature* 275, 104-109 también resulta útil. Con respecto a las células de vertebrados, los reactivos útiles para la transfección de dichas células como, por ejemplo, el fosfato de calcio y el DEAE-dextrano o las formulaciones de liposomas, están disponibles en Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE. UU.

La electroporación también es útil para transformar células y es bien conocida en la técnica para transformar células de levadura, células bacterianas y células de vertebrados.

Por ejemplo, muchas especies bacterianas pueden ser transformadas mediante los procedimientos descritos en Luchansky y col. (1988) *Mol. Microbiol.* 2, 637-646. Se recupera de manera sistemática el mayor número de transformantes después de la electroporación de la mezcla de células y ADN suspendida en 2.5X PEB utilizando 6250 V por cm a 25  $\mu$ FD.

Los procedimientos para la transformación de levadura mediante electroporación se describen en Becker & Guarente (1990) *Methods Enzymol.* 194, 182.

Se pueden usar procedimientos físicos para introducir ADN en células animales y vegetales. Por ejemplo, la microinyección utiliza una pipeta muy fina para inyectar moléculas de ADN directamente en el núcleo de las células que se van a transformar. Otro ejemplo implica el bombardeo de las células con microproyectiles de alta velocidad, generalmente partículas de oro o tungsteno que han sido recubiertas con ADN.

Las células transformadas con éxito, es decir, las células que contienen una construcción de ADN que comprende una secuencia que codifica la proteína AnxA5, pueden identificarse mediante técnicas bien conocidas. Por ejemplo, una técnica de selección implica la incorporación en el vector de expresión de una secuencia de ADN (marcador) que codifica un rasgo seleccionable en la célula transformada. Estos marcadores incluyen dihidrofolato reductasa, G418 o resistencia a neomicina para cultivo de células eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o

ampicilina para cultivar *E.coli* y otras bacterias. De manera alternativa, el gen para tal rasgo seleccionable puede estar en otro vector, que se usa para cotransformar la célula huésped deseada.

El gen marcador se puede usar para identificar transformantes, pero es deseable determinar cuáles de las células contienen moléculas de ADN recombinante y cuáles contienen moléculas de vector autoligadas. Esto se puede lograr utilizando un vector de clonación en el que la inserción de un fragmento de ADN destruye la integridad de uno de los genes presentes en la molécula. Por lo tanto, los recombinantes pueden identificarse debido a la pérdida de la función de ese gen.

Otro procedimiento para identificar con éxito células transformadas implica el cultivo de las células resultantes de la introducción de un constructo de expresión que comprende una secuencia que codifica la proteína AnxA5 para producir el polipéptido de la invención. Las células pueden ser cosechadas y lisadas y su contenido de ADN se puede examinar para detectar la presencia del ADN utilizando un procedimiento como el descrito por Southern (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503 o Berent y col. (1985) *Biotech.* 3, 208. De manera alternativa, la presencia de la proteína en el sobrenadante puede detectarse utilizando anticuerpos como se describe a continuación.

Además de ensayar directamente la presencia de ADN recombinante, la transformación exitosa puede confirmarse mediante procedimientos inmunológicos bien conocidos cuando el ADN recombinante es capaz de dirigir la expresión de la proteína. Por ejemplo, las células transformadas con éxito con un vector de expresión producen proteínas que exhiben una antigenicidad apropiada. Las muestras de células sospechosas de ser transformadas son cosechadas y analizadas para la proteína utilizando anticuerpos adecuados.

De este modo, las propias células huésped transformadas pueden cultivarse para proporcionar un cultivo de células huésped transformadas que expresan la proteína AnxA5. El cultivo puede ser un cultivo monoclonal (clonalmente homogéneo), o un cultivo derivado de un cultivo monoclonal, en un medio nutriente.

El cultivo de células huésped transformadas que expresan la proteína AnxA5 se realiza en condiciones de crecimiento adecuadas hasta que se alcanza una densidad celular deseada, que normalmente se selecciona para equilibrar la productividad con el tiempo y el coste asociados con la fase de cultivo, y luego las células normalmente se recolectan. El tiempo óptimo para la recolección de células puede determinarse empíricamente para cualquier cultivo dado.

La recolección puede implicar, por ejemplo, la recogida de células huésped (que, por lo general están intactas, y que, por lo general, retienen sustancialmente todas (por ejemplo, más del 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 %) de la proteína AnxA5 intracelularmente) del medio de cultivo. Esto se puede lograr comúnmente mediante centrifugación o filtración, para recolectar las células huésped cultivadas en forma de biomasa. En el caso de la centrifugación, el sobrenadante puede descartarse y los sedimentos celulares se pueden transferir directa o indirectamente (por ejemplo, después del almacenamiento, tal como por congelación) a la etapa de homogeneización del cultivo celular.

### C. Homogeneización de cultivos celulares

Como se expuso anteriormente, un primer aspecto de la presente invención proporciona una etapa mejorada de liberación de proteínas desde una célula huésped. Más específicamente, proporciona un procedimiento para la recuperación y/o purificación de una proteína intracelular expresada de forma recombinante que comprende la secuencia de la anexina A5 (AnxA5) de una célula huésped productora de endotoxinas con una pared celular, procedimiento que comprende la liberación de la proteína intracelular de la célula huésped y caracterizado porque la etapa de liberación de la proteína AnxA5 intracelular se realiza en presencia de un tampón de homogeneización que comprende un detergente no iónico.

Preferentemente, el detergente no iónico es un polisorbato, más preferentemente un polisorbato seleccionado entre Tween20 y Tween80, y más preferentemente Tween80. De manera alternativa, aunque de menor preferencia, se puede usar otro detergente no iónico, aunque se prefiere evitar (tanto en la etapa de homogeneización del cultivo celular como en cualquier otra etapa del procedimiento) el uso de detergentes no iónicos que tengan una absorción UV  $\lambda_{\max}$  similar a los máximos de absorción de las proteínas, que se sitúa entre 275 y 280 nm, ya que esto puede interferir con la capacidad de absorción UV para controlar la presencia de proteínas durante el proceso de recuperación. En ese contexto, el término "similar" puede tener el significado de que  $\lambda_{\max}$  está dentro de 10 nm, 9 nm, 8 nm, 7 nm, 6 nm, 5 nm, 4 nm, 3 nm, 2 nm o 1 nm de los máximos de absorción de las proteínas AnxA5 que están siendo purificadas. Así, por ejemplo, puede preferirse que el detergente no iónico no sea Triton X-100, que tiene  $\lambda_{\max} = 275$  nm, y así puede preferirse que Triton X-100 no se use en la etapa de homogeneización del cultivo celular y/o cualquier otra etapa del procedimiento de la presente invención.

Debe observarse que el detergente no iónico puede incluirse en el tampón de homogeneización que se añade a las células (por ejemplo, el tampón de homogeneización puede estar "preformado" con el detergente no iónico presente); o que las células se pueden suspender en el tampón de homogeneización sin el detergente no iónico, y luego el detergente no iónico se puede añadir y mezclar con las células suspendidas en el tampón de homogeneización, antes de la homogeneización de las células a fin de liberar la proteína AnxA5 intracelular.

Preferentemente, la etapa de liberación de la proteína AnxA5 intracelular se lleva a cabo en presencia de un tampón

de homogeneización que comprende una cantidad de detergente no iónico que es eficaz para reducir (tal como en un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más) o evitar la unión entre la anexina A5 y la endotoxina. Los niveles de endotoxinas pueden medirse mediante procedimientos bien conocidos y establecidos en la técnica, por ejemplo, mediante la prueba de lisado de amebocitos de limulus (LAL).

- 5 Por ejemplo, el tampón de homogeneización puede comprender de 0,01 a 10 % (p/p) de detergente no iónico, tal como de 0,02 a 5 % (p/p), de 0,05 a 2 % (p/p), o aproximadamente el 1 % (p/p) de detergente no iónico. El término "aproximadamente" en ese contexto, puede tener el significado de  $\pm$  0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o 0,1 % (p/p).

- Es preferible que no se añadan ni se incluyan iones de calcio o compuestos de calcio ionizables (tales como  $\text{CaCl}_2$ ) en el tampón de homogeneización. Por consiguiente, es preferible que la concentración de iones de calcio libre en el  
10 tampón de homogeneización en el momento de liberar la proteína AnxA5 intracelular de la célula huésped sea inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM o 1 mM, más preferiblemente inferior a 500  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  o sustancialmente cero.

- En una opción, el tampón de homogeneización puede comprender un quelante de iones metálicos de calcio. Puede  
15 ser preferible, en vista de las subsiguientes etapas opcionales que implican un tratamiento enzimático en el que tales enzimas usan  $\text{Mg}^{2+}$  como cofactor, seleccionar un quelante de iones de calcio que no una fuertemente el  $\text{Mg}^{2+}$ , tal como el ácido etilenglicol tetraacético (EGTA). De manera alternativa, las subsiguientes etapas opcionales que implican un tratamiento enzimático en el que tales enzimas usan  $\text{Mg}^{2+}$  como cofactor pueden sustituirse por otras etapas que no requieran  $\text{Mg}^{2+}$ . En ese caso, cualquier quelante de iones de calcio, tal como EGTA o ácido  
20 etilendiaminotetraacético (EDTA), se puede incluir en el tampón de homogeneización.

- Opcionalmente, la concentración de iones de calcio libre y/o la cantidad de quelante de iones metálicos de calcio en el tampón de homogeneización está (o están) en una cantidad eficaz (tal como en un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más) para reducir o evitar la unión entre la anexina A5 y los componentes de la membrana celular y/o la pared de la célula huésped, en comparación con el nivel de unión que se observaría en presencia de  
25 un tampón de homogeneización que consiste en 50 mM Tris HCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  a pH 7,2.

Por ejemplo, el tampón de homogeneización de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención puede comprender de 0,01 a 500 mM, tal como de 0,05 a 100 mM, de 0,5 a 20 mM, de 1 a 15 mM, de 2 a 10 mM, o aproximadamente 4 mM de quelante de iones metálicos de calcio y, de preferencia, siendo el quelante de iones metálicos de calcio EDTA o EGTA.

- 30 Como se expuso anteriormente, la etapa de homogeneización del cultivo celular de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención no incluye una etapa de centrifugación para la purificación y separación de la proteína AnxA5 liberada de los residuos de la célula huésped. Sin embargo, para establecer una tolerancia a los iones de calcio libre y/o una cantidad eficaz de quelante de iones metálicos de calcio en el tampón de homogeneización, se puede realizar una prueba simple utilizando una etapa de centrifugación en una parte alícuota de células lisadas.  
35 Después de la homogeneización celular, la parte alícuota (por ejemplo, 100 mL) de las células lisadas se somete a centrifugación (por ejemplo, a 38.900 g durante 30 minutos) y, a continuación, se separan el sobrenadante y el sedimento. Se determina la cantidad de proteína AnxA5 en el sobrenadante para obtener el nivel de proteína AnxA5 "libre". El sedimento se resuspende en 50 mM Tris HCl, 20 mM EDTA, pH 7,2, con agitación durante 30 minutos a 4 °C, para liberar cualquier proteína AnxA5 unida, y luego se centrifuga a 38.900 g durante 30 minutos a 4 °C, y se  
40 determina la cantidad de proteína AnxA5 unida que se libera en el sobrenadante para obtener el nivel de proteína AnxA5 "unida". En ese contexto, el porcentaje de unión de AnxA5 a los componentes de la membrana celular y/o la pared de la célula huésped = (nivel de proteína AnxA5 "unida" / (nivel de proteína AnxA5 "unida" + nivel de proteína AnxA5 "libre")) x 100.

- Preferentemente, como se determina por el procedimiento anterior, el porcentaje de AnxA5 unida en el  
45 homogeneizado de biomasa resultante es inferior al 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % o sustancialmente 0 %.

- Aunque el presente documento hace referencia a un "tampón de homogeneización", no es necesariamente esencial que la solución sea un tampón de pH. Sin embargo, opcionalmente, el tampón de homogeneización puede comprender además componentes adicionales, incluyendo tampones (por ejemplo, Tris) y, opcionalmente, se puede  
50 ajustar el pH según sea necesario, por ejemplo, a alrededor de pH 6-8, más preferentemente en el rango de pH 7-8,5, tal como aproximadamente 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, u 8,5. En una opción, se puede seleccionar pH 7,4 para su uso.

- Como se expuso anteriormente, también puede ser preferible, en algunas opciones en las que las etapas subsiguientes incluyen el tratamiento enzimático con enzimas que requieren cofactores tales como  $\text{Mg}^{2+}$ , incluir el  
55 cofactor en el tampón de homogeneización.

En una opción a modo de ejemplo, el tampón de homogeneización para uso de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, una solución acuosa de 50 mM Tris, pH

7,4, 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 % (p/p) Tween80.

El procedimiento del primer aspecto de la presente invención puede comprender la etapa de mezclar biomasa de un cultivo de células huésped en el tampón de homogeneización a una concentración de aproximadamente 1 g a 300 g de biomasa (peso húmedo) por litro de tampón de homogeneización, tal como a una concentración de aproximadamente 10 g a 200 g de biomasa por litro de tampón de homogeneización. Concentraciones a modo de ejemplo pueden ser de aproximadamente 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L, 50 g/L, 60 g/L, 70 g/L, 80 g/L, 90 g/L, 100 g/L, 110 g/L, 120 g/L, 130 g/L, 140 g/L, 150 g/L, 160 g/L, 170 g/L, 180 g/L, 190 g/L, o 200 g/L. Un coeficiente de resuspensión de aproximadamente 100 g de biomasa por litro de tampón de homogeneización puede ser particularmente preferido. En ese contexto, el término “aproximadamente” pretende incluir  $\pm$  5 g/L, 4 g/L, 3 g/L, 2 g/L o 1 g/L del valor establecido.

La mezcla se produce generalmente a una temperatura alrededor de la temperatura ambiente, es decir, generalmente alrededor de 18 °C a 28 °C, tal como a aproximadamente 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, o 27 °C. Puede ser preferible controlar la temperatura durante el procedimiento de mezcla para mantenerla en o alrededor de una temperatura seleccionada de la lista anterior (por ejemplo,  $\pm$  5, 4, 3, 2, o 1 °C), aunque, por lo general, no se requiere un control activo de la temperatura en esta etapa.

Opcionalmente, el tampón de homogeneización también puede incluir, o se le puede añadir, después de la mezcla con la biomasa, pero antes de la homogeneización de la célula huésped, una o más enzimas útiles en el tratamiento enzimático. Por ejemplo, puede ser conveniente incluir o añadir una o más enzimas nucleasas para ayudar en la degradación de los ácidos nucleicos (incluido el ADN y/o ARN) de las células huésped, después de la homogeneización. Esto reducirá la viscosidad del homogeneizado producido posteriormente y, por lo tanto, ayudará en las etapas de procesamiento posteriores. Se puede usar cualquier enzima adecuada. La enzima puede ser, por ejemplo, una nucleasa, tal como una nucleasa A, preferentemente una nucleasa A de *Serratia marescens*. Una de estas enzimas a modo de ejemplo de interés es la nucleasa Benzonasa, una endonucleasa de *Serratia marcescens*, que puede obtenerse de numerosas fuentes comerciales, incluyendo Merck/Novagen, Sigma Aldrich y similares, que puede usarse para degradar todas las formas de ADN y ARN sin tener actividad proteolítica. Es eficaz en un amplio rango de condiciones y posee una actividad muy específica. La enzima digiere completamente los ácidos nucleicos a oligonucleótidos terminados en 5'-monofosfato de 2 a 5 bases de longitud (por debajo del límite de hibridación), lo que es ideal para la eliminación de los ácidos nucleicos de las proteínas recombinantes, lo que permite el cumplimiento de las directrices de la FDA para la contaminación por ácidos nucleicos. La enzima Benzonasa requiere 1-2 mM Mg<sup>2+</sup> para su activación, y permanece activa en presencia de detergentes iónicos y no iónicos, agentes reductores, el inhibidor de la proteasa PMSF (1 mM), el quelante EDTA (1 mM) y la urea (la actividad relativa depende de condiciones específicas). Un experto en la materia podrá determinar fácilmente una concentración efectiva de tales enzimas nucleasas, aunque el solicitante ha identificado que la Benzonasa es eficaz al menos cuando se usa prediluida a aproximadamente 3,3 U por L de cultivo de células huésped o a aproximadamente 1,85 U por L de biomasa resuspendida. El término “aproximadamente” en ese contexto puede incluir  $\pm$  90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % o 10 % del número de unidades establecido.

La etapa de liberación de la proteína AnxA5 intracelular de la célula huésped en el tampón de homogeneización puede conllevar cualquier enfoque adecuado para la homogeneización o lisis celular. Por ejemplo, puede consistir en lisar, romper o de otra manera homogeneizar, sonicar o tratar a presión la célula huésped, de manera que la barrera de la pared celular y la membrana celular de la célula huésped se interrumpa y, por lo tanto, libere la proteína AnxA5 intracelular. En ciertas opciones del primer aspecto de la presente invención, esta etapa no incluye el uso de choque osmótico y/o una etapa de congelación-descongelación.

En una opción preferida de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, la etapa de liberación de la proteína AnxA5 intracelular de la célula huésped comprende homogeneización a alta presión, tal como uno o más ciclos de homogeneización a alta presión, a entre aproximadamente 400 bar y aproximadamente 2.500 bar, preferentemente tres ciclos de homogeneización a aproximadamente 600 bar, o dos ciclos de homogeneización a aproximadamente 800 bar. En ese contexto, el término “aproximadamente” puede incluir  $\pm$  500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 20 o 10 bar del valor establecido.

Opcionalmente, por ejemplo, en situaciones en las que no se han añadido enzimas nucleasas para degradar los ácidos nucleicos (por ejemplo, donde las concentraciones de Mg<sup>2+</sup> en el tampón de homogeneización son demasiado bajas, por ejemplo, debido a la inclusión de un quelante de Mg<sup>2+</sup>), entonces puede ser beneficioso incluir múltiples rondas adicionales de homogeneización a alta presión (por ejemplo, de 2 a 4 rondas, a una presión dentro del rango de aproximadamente 600 a 2500 bar) para degradar los ácidos nucleicos y reducir la viscosidad del homogeneizado.

Por consiguiente, tras la homogeneización celular, la etapa de liberación de la proteína AnxA5 intracelular puede crear un homogeneizado de biomasa que comprende la proteína AnxA5 liberada. Preferentemente, el homogeneizado de biomasa es homogéneo, por lo que se incluye el significado de que se desintegran al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o sustancialmente el 100 % de las células de la biomasa.

En función del enfoque de homogeneización celular aplicado, la técnica puede provocar un aumento en la temperatura del homogeneizado. Puede ser preferible utilizar la técnica de homogeneización de células de tal manera y/o aplicar un control de temperatura para evitar aumentos indeseables de temperatura. Sin embargo, por ejemplo, en el caso de que el homogeneizado contenga un tratamiento enzimático, tal como Benzonasa, entonces puede ser ventajoso usar el aumento de temperatura para aproximarse más al rango de temperatura óptimo de la enzima y, preferentemente estar dentro del mismo. En el caso de Benzonasa, temperaturas en el rango de aproximadamente 36 a 40 °C pueden ser particularmente adecuadas.

En el caso de que el procedimiento de homogeneización de células incluya un tratamiento enzimático con una enzima que requiera un cofactor de iones metálicos (por ejemplo,  $Mg^{2+}$ ) y, además, en el caso de que el tampón de homogeneización excluya el quelante de iones metálico de calcio, entonces, en una opción, el quelante de iones de calcio se podrá añadir una vez finalizado el tratamiento enzimático. Esto puede ocurrir antes o después de una etapa de aclarado, como se explica a continuación.

Después de la homogeneización celular, el homogeneizado de biomasa comprende además una o más (generalmente todas) de las impurezas seleccionadas del grupo que consiste en proteínas de la célula huésped, componentes de la pared de la célula huésped, componentes de la membrana de la célula huésped, ácido nucleico de la célula huésped y endotoxina.

Es preferible que la viscosidad del homogeneizado sea adecuadamente baja para ayudar en las etapas de procesamiento posteriores.

#### D. Aclarado del homogeneizado

Opcionalmente, puede ser preferible que, después de la producción del homogeneizado de biomasa, este se trate con una etapa de aclarado.

Por consiguiente, en una opción adicional del primer aspecto de la presente invención, el procedimiento comprende además la etapa de aclarado del homogeneizado de biomasa, produciéndose así un producto aclarado que comprende la proteína AnxA5 liberada. Esta etapa se lleva a cabo para reducir el contenido de ácidos nucleicos y, adicionalmente, para obtener una solución con partículas reducidas que se puede aplicar a las subsiguientes etapas de purificación, como la cromatografía de captura, tal como se explica más adelante.

Se puede llevar a cabo cualquier etapa o combinación de etapas de aclarado adecuadas. Por ejemplo, el procedimiento de aclarado puede comprender (preferiblemente, después del tratamiento con nucleasa), la etapa de pasar el homogeneizado de biomasa que comprende la proteína AnxA5 liberada a través de un filtro, tal como un filtro de celulosa o polipropileno, en la que el efluente del filtro es el producto aclarado que comprende la proteína AnxA5 liberada.

Preferentemente, el filtro es un filtro de profundidad, y/o preferentemente el filtro tiene un corte de menos de 4  $\mu m$ , tal como un corte de menos de 3  $\mu m$ , 2  $\mu m$  o 1  $\mu m$ , y lo más preferentemente un corte dentro del rango de 0,2 a 0,6  $\mu m$ . Por ejemplo, el homogeneizado se puede aclarar por filtración utilizando un filtro de profundidad de corte de 0,6-0,2  $\mu m$ , ejemplos de los cuales están disponibles comercialmente, por ejemplo, tales como los filtros de profundidad Cuno 60 SP basados en celulosa. Otros filtros de profundidad que proporcionan un buen rendimiento (es decir, una buena filtración sin pérdida de producto), aunque menos que los filtros de profundidad de celulosa Cuno 60 SP preferidos con un corte de 0,6-0,2  $\mu m$ , incluyen un filtro de celulosa + kieselguhr con un corte de 0,5  $\mu m$  (por ejemplo, PR12 UP disponible en Begerow); un filtro de polipropileno con un corte de 1,2  $\mu m$  (por ejemplo, Sartopure PP2 disponible de Sartorius); un filtro de celulosa con un corte de 0,1  $\mu m$  (por ejemplo, Sartoclear S9 disponible de Sartorius); un filtro de polipropileno con un corte de 0,65  $\mu m$  (por ejemplo, Sartopure PP2 disponible de Sartorius); y un filtro de celulosa con un corte de 0,2-0,5  $\mu m$  (por ejemplo, EK 1P o EKM-P, ambos disponibles en Pall, que resultaron buenos pero lentos). Pruebas adicionales mostraron que los filtros con cortes más grandes (por ejemplo, > 4  $\mu m$ ) lograron solo una eliminación moderada de partículas, y por lo tanto son menos preferidos.

El solicitante también ha comprobado que los filtros basados en celulosa con carga positiva reducen adicionalmente el contenido de ADN en el homogeneizado aclarado y, por lo tanto, pueden representar una clase de filtros particularmente preferida para su uso en la etapa de aclarado.

Además, se ha encontrado que, para proporcionar un aclarado eficaz, los filtros basados en celulosa requieren un área de filtro más pequeña que los filtros de polipropileno correspondientes. Esta puede ser una razón adicional para preferir particularmente la clase de filtros basados en celulosa para su uso en la etapa de aclarado.

La selección del área de filtro también puede depender de la extensión y naturaleza de la homogeneización utilizada. Por ejemplo, el solicitante ha comprobado que en el caso de la homogeneización celular que se realiza mediante tres ciclos de homogeneización de aproximadamente 600 bar, un área de filtro de aproximadamente 60  $cm^2$  por 1L de homogeneizado resulta adecuada, mientras que, en el caso de la homogeneización celular que se realiza mediante dos ciclos de homogeneización de aproximadamente 800 bar, un área de filtro de aproximadamente 180  $cm^2$  por 1L de homogeneizado resulta adecuada. Por consiguiente, el filtro de profundidad puede seleccionarse opcionalmente para tener un área de 10 a 500  $cm^2$  por L de homogeneizado aclarado, tal como de 30 a 400  $cm^2/L$ ,

de 40 a 250 cm<sup>2</sup>/L, de 50 a 200 cm<sup>2</sup>/L o de 60 a 180 cm<sup>2</sup>/L, tal como de 50-100 cm<sup>2</sup>/L, o 60-80 cm<sup>2</sup>/L; o de 120-240 cm<sup>2</sup>/L, o 150-210 cm<sup>2</sup>/L.

Después del aclarado, el producto aclarado puede ajustarse adicionalmente mediante la adición de uno o más aditivos adicionales en preparación para las etapas posteriores. Por ejemplo, puede ser conveniente acondicionar el producto aclarado mediante la adición de uno o ambos de: (a) un detergente no iónico, tal como polisorbato y más preferiblemente Tween80; y (b) un quelante de iones metálicos de calcio, tal como el EDTA, a menos que el producto aclarado ya contenga niveles adecuados del quelante en virtud de su inclusión en el tampón de homogeneización y/o por su adición después de la etapa de tratamiento enzimático.

En una opción a modo de ejemplo, el producto aclarado se diluye aproximadamente 2 veces con un 1 % de detergente no iónico (más preferiblemente Tween80), y se añade un quelante de iones de calcio (más preferiblemente EDTA) a una concentración final de aproximadamente 2 mM.

Una característica ventajosa adicional del procedimiento de la presente invención es la falta de necesidad de etapas de diálisis, que requieren mucho tiempo, en el producto aclarado antes de otras etapas adicionales de captura cromatográfica, tales como la captura de intercambio aniónico, tal como se describe a continuación. Por consiguiente, en una opción adicional del primer aspecto de la presente invención, el producto aclarado no se somete a diálisis antes de la captura cromatográfica de la proteína AnxA5.

### E. Captura de intercambio aniónico

De acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, un procedimiento puede comprender, además, la etapa de someter la proteína AnxA5 liberada a una resina de intercambio aniónico para realizar una primera etapa de captura de intercambio aniónico, y producir así un primer producto de intercambio aniónico que comprende la proteína AnxA5 liberada.

En general, la captura de proteínas mediante cromatografía de intercambio aniónico de homogeneizado/lisado bacteriano (por ejemplo, *E. coli*) no es una estrategia de primera elección, ya que grandes cantidades de proteínas de la célula huésped (PCH) y de ADN se unen a la resina de captura, lo que afecta a las capacidades de unión del producto de destino e incluso estresa el rendimiento de la resina. Sin embargo, el solicitante ha determinado que los anteriores procedimientos de homogenización y aclarado de células de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención son eficaces para proporcionar un producto de proteína AnxA5 que puede purificarse de manera más eficaz utilizando cromatografía de intercambio aniónico.

Por consiguiente, en una opción, el producto aclarado que comprende la proteína AnxA5 liberada, tal como se produce en la etapa de aclarado del homogeneizado/lisado, y/o la degradación de los ácidos nucleicos, tal como se explicó anteriormente, se somete a la primera etapa de captura de intercambio aniónico, para producir así un primer producto de intercambio aniónico que comprende la proteína AnxA5 liberada.

Opcionalmente, antes de la primera etapa de intercambio aniónico, se ajusta o ajustan uno o más parámetros del entorno de la proteína AnxA5 liberada, seleccionados del grupo que consiste en el pH, la conductividad, el nivel de quelante de iones de calcio y el nivel de detergente no iónico. Por ejemplo, la composición de la proteína AnxA5 que se somete a la etapa de intercambio aniónico se puede formular a un pH de aproximadamente 6,9, opcionalmente  $\pm 1$ , 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 unidades de pH (en una opción, un rango preferido es pH 6-8,5, más preferentemente pH 6,5-7,5, más preferentemente pH 6,9). El solicitante ha descubierto que los valores bajos de pH alrededor de este rango (por ejemplo, a pH 6) tienden a provocar la presencia de proteínas de la célula huésped detectables en el producto eluido; mientras que la resolución se reduce un poco a pH 8 o superior. La composición de la proteína AnxA5 que se somete a la etapa de intercambio aniónico puede ajustarse opcionalmente para tener una conductividad de aproximadamente 2,8 mS/cm,  $\pm 1$ , 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 mS/cm. Después del aclarado, el producto aclarado puede ajustarse aún más mediante la adición de uno o más aditivos adicionales a modo de preparación para las etapas posteriores. Como ya se explicó anteriormente, puede ser conveniente, antes de la primera etapa de intercambio aniónico, acondicionar la composición de la proteína AnxA5 que se somete a la etapa de intercambio aniónico mediante la adición de uno o ambos de: (a) un detergente no iónico, tal como polisorbato y más preferentemente Tween80; y (b) un quelante de iones metálicos de calcio, tal como el EDTA, a menos que el producto aclarado ya contenga niveles adecuados del quelante en virtud de su inclusión en el tampón de homogeneización y/o por su adición después de la etapa de tratamiento enzimático. En una opción a modo de ejemplo, la composición de la proteína AnxA5 que se somete a la etapa de intercambio aniónico se diluye aproximadamente 2 veces con un 1 % de detergente no iónico (más preferentemente Tween80), y se añade un quelante de iones de calcio (más preferentemente EDTA) a una concentración final de aproximadamente 2 mM.

En este contexto, el uso de un detergente no iónico y/o un quelante de iones metálicos de calcio para acondicionar la composición de la proteína AnxA5 que se somete a la primera etapa de captura de intercambio aniónico puede ser altamente beneficioso para mejorar la separación de la proteína AnxA5 de las impurezas derivadas de la célula huésped (incluyendo los componentes de la pared celular, los componentes de la membrana celular, las endotoxinas, los ácidos nucleicos, etc.) en la primera etapa de captura de intercambio aniónico. Por ejemplo, el solicitante ha demostrado una eliminación altamente eficaz de la endotoxina (alrededor de una reducción del 99 %)



por la primera etapa de intercambio aniónico de captura cuando se realiza en presencia de un detergente no iónico y un quelante de iones metálicos de calcio.

Aunque se analiza principalmente a continuación en el contexto de la segunda etapa de pulido por intercambio aniónico, en la opción en la cual un quelante de iones metálicos de calcio (por ejemplo, el EDTA) está presente en la composición de la proteína AnxA5 que se somete a la primera etapa de captura de intercambio aniónico, también puede ser beneficioso para el funcionamiento de la primera etapa de captura de intercambio aniónico, incluir uno o más tipos de iones metálicos (no de calcio) seleccionados adicionales, seleccionándose tales iones metálicos seleccionados adicionales de manera que el quelante de iones metálicos de calcio tenga una afinidad de unión a los iones metálicos seleccionados mayor que su afinidad de unión a la resina de intercambio aniónico, pero menor que su afinidad de unión a los iones de calcio. Un ion metálico a modo de ejemplo es  $Mg^{2+}$ .

Normalmente, antes de la puesta en contacto de la resina de intercambio aniónico y el producto AnxA5, se equilibra la resina de intercambio aniónico. Se puede usar cualquier equilibrio adecuado. Por ejemplo, la resina de intercambio aniónico se puede equilibrar con un tampón (por ejemplo, 20 mM Tris, pH 7,4), un detergente no iónico (por ejemplo, polisorbato al 0,1 %, preferentemente Tween80) y sal (por ejemplo, 25 mM NaCl). Se puede usar cualquier volumen de equilibrado adecuado; sin limitación, el solicitante ha descubierto que 3 volúmenes de columna (VC) son un volumen adecuado en el procedimiento ejemplificado.

Preferentemente, la primera etapa de captura de intercambio aniónico se ejecuta en modo positivo con respecto a la proteína AnxA5, por lo que la proteína AnxA5 se une temporalmente al intercambiador aniónico durante la etapa de intercambio aniónico, generalmente se pasa una solución de lavado sobre la columna para eliminar las impurezas de la proteína AnxA5 unida, y a continuación se produce el primer producto de intercambio aniónico que comprende la proteína AnxA5 liberada aplicando un tampón de elución a la resina de intercambio aniónico para liberar la proteína AnxA5 unida.

Se prefieren las resinas de intercambio aniónico fuertes, ya que el solicitante ha descubierto que estas proporcionan capacidades aceptables para la captura de la proteína AnxA5, mientras que el rendimiento con resinas de intercambio aniónico débiles resultó menos aceptable. Las resinas de intercambio aniónico fuertes son bien conocidas en la técnica, y los ejemplos incluyen resinas con un grupo funcional de amonio cuaternario, como una resina de Tipo I que tiene cloruro o hidróxido de trialkilamonio, o resinas de Tipo II que tienen cloruro o hidróxido de dialquil 2-hidroxiethyl amonio (por ejemplo, Q Sepharose XL de GE Healthcare, Capto Q de GE Healthcare, Unosphere Q de Biorad o Eshmuno Q de Merck). Las resinas de intercambio aniónico débiles no son las preferidas, y los ejemplos incluyen la resina DEAE con un grupo funcional dietilaminoetilo. La resina Q Sepharose XL (por ejemplo, según provista por GE Healthcare) puede ser la más preferida.

Después de la carga en la resina de intercambio aniónico, en modo positivo, la proteína AnxA5 se une temporalmente a la resina y se puede lavar para reducir/eliminar las impurezas. Se pueden emplear cualesquiera condiciones de lavado adecuadas. Por ejemplo, la solución de lavado puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, una solución acuosa de un tampón (por ejemplo, 20 mM Tris, pH 7,4), un detergente no iónico (por ejemplo, polisorbato al 0,1%, preferentemente Tween80) y sal (por ejemplo, 25 mM NaCl). Se puede usar cualquier volumen de lavado adecuado; sin limitación, el solicitante ha descubierto que 10 volúmenes de columna (VC) son un volumen adecuado en el procedimiento ejemplificado.

La proteína AnxA5 unida se libera luego de la resina de intercambio aniónico utilizando un tampón de elución. Se puede emplear cualquier tampón de elución adecuado. Por ejemplo, el tampón de elución puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, una solución acuosa de un tampón (por ejemplo, 20 mM Tris, pH 7,4), un detergente no iónico (por ejemplo, 0,01 a 1 % (p/v) más preferentemente 0,1 % (p/v) de polisorbato, preferentemente Tween80) y sal a una concentración superior a la de la solución de lavado (por ejemplo, 300 mM NaCl, opcionalmente  $\pm$  100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 o 5 mM). Se puede usar cualquier volumen de elución adecuado; sin limitación, el solicitante ha descubierto que 9 volúmenes de columna (VC) son un volumen adecuado para la elución en el procedimiento ejemplificado.

Por consiguiente, la proteína AnxA5 se captura en el tampón de elución, y esto proporciona el primer producto de intercambio aniónico.

La resina de intercambio aniónico puede entonces regenerarse y limpiarse. Los procedimientos adecuados para la regeneración y limpieza son conocidos en la técnica, y uno de tales protocolos adecuados se analiza en los ejemplos.

Generalmente, el primer producto de intercambio aniónico que comprende la proteína AnxA5 liberada contiene sustancialmente más del 50 % de la proteína AnxA5 que se liberó de las células huésped. Preferentemente, el primer producto de intercambio aniónico comprende más del 60 %, 70 % u 80 % de la proteína AnxA5 que provenía de las células huésped. Por punto de comparación con el procedimiento de Marder y col. (supra), es evidente que los procedimientos de la técnica anterior demostraron grandes pérdidas de producto, de aproximadamente el 50 % o más. Por ejemplo, el procedimiento de Marder y col. (supra) implica una etapa de centrifugación de purificación inicial que descarta el sobrenadante y recoge la anexina A5 unida al sedimento. Las cantidades relativas de anexina

A5 en el sobrenadante descartado y recuperadas del sedimento se muestran en la Figura 3, carriles 2 y 3, respectivamente, de Marder y col. (supra). De esa figura se desprende que aproximadamente la mitad de la anexina A5 liberada se desecha en el procedimiento de Marder y col. (supra), lo que lleva a un procedimiento de bajo rendimiento.

- 5 Como punto de comparación adicional, el solicitante ha descubierto que el rendimiento del procedimiento ejemplificado proporciona un rendimiento de aproximadamente 5 g de proteína AnxA5 por litro de cultivo al final de la primera etapa de captura por cromatografía de intercambio aniónico, que es muy superior al rendimiento registrado en Marder y col. (supra), (véase la sección “Conclusiones”, segundo párrafo) de 0,983 g de proteína de anexina A5 purificada por litro de cultivo.
- 10 Por consiguiente, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, se prefiere que el primer producto de intercambio aniónico comprenda más de 1 g, más de 2 g, más de 3 g, más de 4 g, o aproximadamente 5 g de proteína AnxA5 por litro de cultivo.

Opcionalmente, el primer producto de intercambio aniónico se somete, directa o indirectamente, a una etapa de filtración (tal como una etapa de filtración estéril). Por ejemplo, sin limitación, se ha descubierto que una etapa de filtración de 0,45 a 0,2  $\mu$ M es adecuada.

15

#### F. Cromatografía de afinidad

El solicitante también ha descubierto (por ejemplo, véase el Ejemplo 2 a continuación) que, contrariamente a los procedimientos convencionales en los que la adición sucesiva de etapas de purificación tiende a provocar una pérdida de rendimiento cada vez mayor (ya que el producto se pierde en cada etapa), la combinación de una etapa de intercambio aniónico y una etapa de cromatografía de afinidad con heparina tiene la sorprendente ventaja de alcanzar la alta pureza obtenida con la etapa de cromatografía de afinidad con heparina sola, pero con un rendimiento sustancialmente mayor (es decir, la recuperación aumenta de aproximadamente 30-40 % a aproximadamente 70-90 %). El gran aumento en el rendimiento asociado con la adición de una etapa de purificación es directamente opuesto a lo que normalmente se esperaría de la combinación de etapas de purificación.

20

- 25 Por consiguiente, una primera realización preferida del primer aspecto de la presente invención puede incluir un procedimiento para la recuperación y/o purificación de la proteína que comprende la secuencia de anexina A5 (AnxA5), a partir de una solución que comprende la proteína AnxA5 y una o más impurezas (que pueden o no ser el producto de una etapa de aclarado tal como se describió anteriormente), que comprende

30

someter la solución que contiene la proteína AnxA5 y una o más impurezas (solución que puede o no ser el producto directo o indirecto de una homogeneización celular, aclarado y/o primera etapa de captura por cromatografía de intercambio aniónico, tal como se explicó anteriormente) a una resina intercambiadora de aniones para realizar una primera etapa de intercambio aniónico, y producir así un primer producto de intercambio aniónico que comprende la proteína AnxA5; y

35

someter el primer producto de intercambio aniónico, directa o indirectamente, a una etapa de cromatografía de afinidad, para producir así un primer producto de cromatografía de afinidad que comprende la proteína AnxA5 liberada.

Preferentemente, de acuerdo con el procedimiento de la primera realización preferida del primer aspecto de la presente invención, la etapa de cromatografía de afinidad puede comprender la unión de la proteína AnxA5 a heparina inmovilizada y, opcionalmente, en donde la unión es promovida por la presencia de iones de calcio y, además, opcionalmente, la proteína AnxA5 se eluye de la heparina inmovilizada utilizando un tampón de elución que contiene un quelante de iones de calcio, tal como el EDTA.

40

Además, como se explicó en el Ejemplo 3, el solicitante ha descubierto que Tween80 tiene un efecto particularmente ventajoso (en comparación con otros detergentes no iónicos, incluyendo otros Tweens, tal como Tween20) en una etapa de cromatografía de afinidad con heparina. La inclusión de Tween 80, por ejemplo, en aproximadamente un 0,1 % (p/v) en los tampones utilizados en la etapa de cromatografía de afinidad con heparina puede ayudar a eluir la proteína AnxA5 en un solo pico, reducir la presión y evitar la precipitación.

45

Por consiguiente, una segunda realización preferida del primer aspecto de la presente invención puede incluir un procedimiento para la recuperación y/o purificación de la proteína que comprende la secuencia de anexina A5 (AnxA5), a partir de una solución que comprende la proteína AnxA5 y una o más impurezas, que consiste en someter la solución que comprende la proteína AnxA5 y una o más impurezas (solución que puede ser, o no, el producto directo o indirecto de una etapa de homogeneización celular, aclarado y/o primera etapa de captura por cromatografía de intercambio aniónico, tal como se ha discutido anteriormente) a una etapa de cromatografía de afinidad con heparina en presencia de Tween80 (preferentemente en presencia de Tween80 al 0,1 %), para producir así un primer producto de cromatografía de afinidad que comprende la proteína AnxA5 liberada.

50

- 55 De este modo, tanto la primera como la segunda realizaciones preferidas del primer aspecto de la presente invención, que pueden funcionar independientemente entre sí o en combinación (es decir, la etapa de cromatografía de afinidad con heparina en el segundo aspecto de la presente invención puede incluir Tween 80 (por ejemplo, a

aproximadamente un 0,1% (p/v)) en los tampones utilizados en la etapa de cromatografía de afinidad con heparina.

En términos más generales, sin embargo, el primer aspecto de la presente invención puede comprender la etapa de someter la proteína AnxA5 liberada a una etapa de cromatografía de afinidad, para producir así un primer producto de cromatografía de afinidad que comprende la proteína AnxA5 liberada. Puede ser particularmente preferible que la proteína AnxA5 en el primer producto de intercambio aniónico, por ejemplo, tal como se produce mediante un procedimiento como el descrito anteriormente, pueda someterse directa o indirectamente (por ejemplo, después de la filtración estéril y/o la adición de otros componentes) a la etapa de cromatografía de afinidad.

Por consiguiente, opcionalmente, el procedimiento del primer aspecto de la presente invención (que puede combinarse con cualquiera o ambas características de la primera y segunda realizaciones preferidas del primer aspecto de la presente invención) comprende etapas en las que:

(a) un homogeneizado de biomasa que comprende la proteína AnxA5 liberada tal como se describe anteriormente se aclara mediante un procedimiento de aclarado tal como se describe anteriormente y, de ese modo, produce un producto aclarado que comprende la proteína AnxA5 liberada, y

(b) la proteína AnxA5 en el producto aclarado se somete a una resina de intercambio aniónico para realizar una primera etapa de intercambio aniónico tal como se describió anteriormente, y así producir un primer producto de intercambio aniónico que comprende la proteína AnxA5, y

(c) la proteína AnxA5 en el primer producto de intercambio aniónico se somete (directa o indirectamente) a una etapa de cromatografía de afinidad.

Preferiblemente, la etapa de cromatografía de afinidad comprende la unión de la proteína AnxA5 a la heparina inmovilizada y, opcionalmente, la unión se promueve mediante la presencia de iones de calcio.

Por consiguiente, antes de la etapa de afinidad con heparina, el producto AnxA5 se puede acondicionar mediante la adición de uno o más de iones de calcio (por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$ ), detergente no iónico (preferiblemente Tween80) y opcionalmente tamponado (por ejemplo, tampón Tris a pH 7,4). Sin limitación, el solicitante ha demostrado un efecto beneficioso cuando el producto de intercambio aniónico filtrado se diluye aproximadamente 8 veces con un tampón de dilución que contiene 20 mM Tris, pH 7,4, Tween80 al 0,1 % y 2 mM  $\text{CaCl}_2$ .

Por lo tanto, puede preferirse que el producto de AnxA5 se acondicione con polisorbato 80, y más preferentemente en el que el polisorbato 80 esté en una concentración final de más de aproximadamente 0,01 % hasta aproximadamente 10 % (p/v), tal como alrededor de 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,10 %, 0,11 %, 0,12 %, 0,13 %, 0,14 %, 0,15 %, 0,16 %, 0,17 %, 0,18 %, 0,19 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 %. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a  $\pm$  50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o 5 % del valor establecido.

La dilución con calcio permite que la anexina A5 se una a la cromatografía de heparina inmovilizada. Esta interacción es, en comparación con una interacción iónica, lenta. El tiempo de contacto es importante y, por lo tanto, la cromatografía se realiza preferiblemente con  $\leq$  100 cm/h.

Las condiciones utilizadas en la carga de la columna de cromatografía de afinidad (por ejemplo, la columna de cromatografía de afinidad con heparina) permiten la unión de la proteína AnxA5 a la heparina. Es decir, la cromatografía de afinidad se realiza normalmente en modo positivo con respecto a la proteína AnxA5.

La columna de cromatografía de afinidad (por ejemplo, la columna de cromatografía de afinidad con heparina) se puede cargar con el nivel deseado de producto AnxA5. Por ejemplo, la carga se puede realizar a aproximadamente, o a más de, 5 g por litro de volumen de resina en la columna, tal como aproximadamente 10 g/L, aproximadamente 15 g/L, aproximadamente 20 g/L, aproximadamente 25 g/L, aproximadamente 30 g/L o más. El término "aproximadamente" en este contexto se refiere a  $\pm$  50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o 5 % del valor establecido. En la práctica, el solicitante ha descubierto que la carga de aproximadamente 20 a 30 g de producto AnxA5 por litro de volumen de resina en la columna proporciona resultados altamente satisfactorios en términos de eficacia del procedimiento y de purificación y recuperación del producto. En el contexto de cargas tan altas, el solicitante ha constatado que la presencia de polisorbato 80 en la mezcla a cargar es particularmente beneficiosa para evitar la precipitación o insolubilidad de la proteína AnxA5. En ausencia del uso de polisorbato 80, se observa precipitación y un aumento en la contrapresión, y la etapa de cromatografía de afinidad se vuelve menos eficaz. Véanse los Ejemplos 3 y 4.

Después de cargar la proteína AnxA5, la columna se lava normalmente una o más veces para eliminar las impurezas. Se puede utilizar cualquier protocolo de lavado adecuado. El solicitante había descubierto, sin limitación, que un protocolo de lavado adecuado incluye un lavado de dos fases. Por ejemplo, en una primera fase de lavado, se puede realizar un lavado utilizando un primer tampón de lavado que contenga calcio (por ejemplo, 20 mM Tris, pH 7,4; Tween80 al 0,1 %; 2 mM  $\text{CaCl}_2$ ). El volumen de lavado de la primera fase puede variar en función del resultado deseado y de la naturaleza exacta de la solución de lavado utilizada. Sin limitación, el solicitante ha descubierto, por ejemplo, que el tampón de lavado a modo de ejemplo mencionado anteriormente se puede usar con éxito con 15 VC de lavado. En una segunda fase de lavado, el tampón de lavado puede contener calcio en una cantidad que es

inferior a la del primer lavado, o preferentemente no contener calcio (por ejemplo, 20 mM Tris, pH 7,4; Tween80 al 0,1 %). El volumen de lavado de la segunda fase puede variar en función del resultado deseado y de la naturaleza exacta de la solución de lavado de la segunda fase utilizada. Sin limitación, el solicitante ha descubierto, por ejemplo, que el tampón de lavado de la segunda fase a modo de ejemplo mencionado anteriormente se puede usar con éxito con 2 VC de lavado.

Posteriormente, la proteína AnxA5 se eluye de la columna de cromatografía de afinidad utilizando un tampón de elución, proporcionado así el primer producto de cromatografía de afinidad que comprende la proteína AnxA5 liberada. En el caso de usar una columna de cromatografía de afinidad con heparina, se puede preferir usar un tampón de elución que comprenda un quelante de iones metálicos de calcio, tal como EDTA o EGTA.

Por ejemplo, sin limitación, el solicitante ha descubierto que un tampón de elución adecuado es 20 mM Tris, pH 7,4; Tween80 al 0,1%; 10 mM EDTA; 25 mM NaCl, que quelata los iones de calcio. La reacción de quelación eluye específicamente la anexina A5, que solo puede unirse a la heparina en presencia de calcio.

Puede resultar preferible reducir el caudal a menos de 100 cm/h durante la elución para aumentar la concentración del producto. Por ejemplo, sin limitación, en los ejemplos, el solicitante permitió una elución concentrada al reducir el caudal a  $\leq 60$  cm/h en la elución. El pico de elución completo se puede recoger, por ejemplo, a partir de la subida de la señal UV a 0,05 AU a 0,05 AU en el pico descendente, representando aproximadamente 7 VC. Preferentemente, el perfil de elución muestra un solo pico que, de manera ideal, es un pico agudo.

Por consiguiente, el primer producto de cromatografía de afinidad comprende la proteína AnxA5 liberada y el quelante de iones de calcio, tal como EDTA o EGTA, en el que opcionalmente el quelante de iones de calcio está presente en el rango de aproximadamente 0,1 mM a 500 mM, tal como aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, más generalmente en el rango de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, más preferentemente en el rango de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM y, más de preferencia, aproximadamente 10 mM. El término "aproximadamente" en ese contexto puede incluir el significado de  $\pm 50$  %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o 1 % de las concentraciones establecidas.

La etapa de cromatografía de afinidad puede ser la etapa de purificación más poderosa en el esquema del procedimiento. La proteína AnxA5 se une a los iones de calcio y, en este estado de unión al calcio, el producto puede formar una unión altamente específica con la heparina. Por lo general, solo las formas de proteína AnxA5 correctamente plegadas que tienen la capacidad de formar complejos con el calcio se pueden unir a la heparina. Por lo tanto, la etapa de cromatografía de afinidad puede ser útil para ayudar a discriminar entre el producto correctamente plegado y el producto mal plegado. Además, la etapa intermedia alcanza altos factores de agotamiento, ya que la interacción altamente específica se combina con un modo de elución específico mediante la reacción del quelato del calcio con el EDTA. Por lo tanto, se observa una fuerte reducción de la endotoxina y la PCH combinada con una reducción moderada del contenido de ADN. La endotoxina, que normalmente ya se ha reducido (preferentemente en aproximadamente un 97 %) durante la etapa de captura de intercambio aniónico anterior, se reduce aún más (preferentemente en aproximadamente un 99 %), y esto lleva preferentemente los niveles de endotoxinas a aproximadamente un 0,03 % de los niveles en el producto aclarado antes de la primera etapa de captura de intercambio aniónico.

### G. Pulido por intercambio aniónico

Opcionalmente, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención (que incluye, por ejemplo, la primera y/o segunda realizaciones del primer aspecto de la presente invención), un producto AnxA5 (por ejemplo, tal como se produce por la etapa de cromatografía de afinidad) puede, directa o indirectamente, purificarse aún más mediante una etapa de pulido por intercambio aniónico.

En el caso de que el producto AnxA5 producido por la etapa de cromatografía de afinidad se purifique adicionalmente de manera indirecta mediante una etapa de pulido por intercambio aniónico, las etapas de cromatografía de afinidad y la etapa de pulido por intercambio aniónico pueden separarse mediante la adición de uno o más aditivos acondicionadores al producto de la etapa de cromatografía de afinidad.

Los aditivos adecuados pueden incluir, por ejemplo, un diluyente (por ejemplo, agua) para diluir adicionalmente la proteína AnxA5 en el producto del producto de cromatografía de afinidad; un tampón (por ejemplo, Tris, por ejemplo a 35 mM y pH 8); un detergente no iónico (por ejemplo, polisorbato, más preferentemente Tween80, tal como a una concentración de aproximadamente 0,1 % p/v); y/o uno o más aditivos adicionales basados en la tercera realización preferida del primer aspecto de la presente invención, tal como se describe a continuación.

Es decir, una tercera realización preferida del primer aspecto de la presente invención se basa en la comprensión por parte del solicitante de que los quelantes de iones metálicos de calcio (por ejemplo, el EDTA) pueden tener un impacto negativo en la eficacia de las etapas de intercambio aniónico. El EDTA libre (u otro quelante) puede unirse directamente a los grupos de funciones de intercambio aniónico, reduciendo así la capacidad y también la separación lograda por una etapa de intercambio aniónico. Este es un problema particular en el caso de realizar un intercambio aniónico en el producto de una etapa de cromatografía de afinidad con heparina, en la que la proteína AnxA5 se une a la heparina en presencia de iones de calcio, y luego se utiliza un quelante de iones metálicos de

calcio (por ejemplo, el EDTA) para eluir la proteína AnxA5 unida. Como consecuencia, el producto AnxA5 eluido de la etapa de cromatografía de afinidad con heparina contiene altos niveles de quelante de iones de calcio. En general, es deseable poder purificar más el producto AnxA5 con una etapa adicional de intercambio aniónico, pero el quelante de iones de calcio es un componente problemático durante esa etapa adicional de intercambio aniónico.

- 5 Por otro lado, tratar de eliminar el quelante de iones metálicos de calcio antes de una etapa de intercambio aniónico requiere mucho tiempo y, por lo tanto, también aumenta los costes. En consecuencia, los procedimientos de la técnica anterior que implican, por ejemplo, etapas de diálisis para el reemplazo del tampón son lentos e ineficaces, lo que aumenta los costes de producción. Además, la inclusión del quelante de iones metálicos de calcio en el producto AnxA5 durante la etapa de intercambio aniónico puede ser un componente importante para prevenir la
- 10 unión mediada por calcio de la proteína AnxA5 a las impurezas, incluida la endotoxina. Por lo tanto, sería conveniente y eficaz introducir un aditivo que bloquee o reduzca la unión del quelante de iones de calcio a la resina de intercambio aniónico, pero que permita que la etapa de intercambio aniónico se realice sin los inconvenientes y costes asociados a la diálisis, y sin evitar el efecto beneficioso del quelante de iones metálicos de calcio durante la etapa de intercambio aniónico.
- 15 El solicitante se ha dado cuenta de que esto puede lograrse mediante la inclusión en el producto de proteína AnxA5, antes del intercambio aniónico, de uno o más tipos de iones metálicos seleccionados adicionales, en el que los iones metálicos seleccionados adicionales se seleccionan de manera tal que el quelante de iones metálicos de calcio tiene una afinidad de unión a los iones metálicos seleccionados mayor que su afinidad de unión a la resina de intercambio aniónico, pero menor que su afinidad de unión a los iones de calcio. La selección de los iones metálicos adicionales apropiados dependerá de la naturaleza del quelante de iones de calcio y de la naturaleza de la resina de intercambio aniónico. Por ejemplo, en el caso de usar EDTA como quelante de iones de calcio, los iones  $Mg^{2+}$  son generalmente adecuados para lograr el objetivo de la presente invención, y se pueden añadir al producto de la proteína AnxA5 antes de una etapa de intercambio aniónico.

- 25 Por consiguiente, una tercera realización preferida del primer aspecto de la presente invención puede incluir un procedimiento para la recuperación y/o purificación de la proteína que comprende la secuencia de anexina A5 (AnxA5) de una composición que comprende la proteína AnxA5 y un quelante de iones metálicos de calcio,

- 30 caracterizado porque tal procedimiento comprende someter la composición a una resina de intercambio aniónico para realizar una etapa de intercambio aniónico y así recuperar y/o purificar la proteína AnxA5 de la composición, y también caracterizado porque la etapa de intercambio aniónico se realiza en presencia de iones metálicos seleccionados adicionales, en el que los iones metálicos seleccionados adicionales se seleccionan de manera que el quelante de iones metálicos de calcio tenga una afinidad de unión a los iones metálicos seleccionados mayor que su afinidad de unión a la resina de intercambio aniónico, pero menor que su afinidad de unión a los iones de calcio.

- 35 Preferentemente, los iones metálicos seleccionados adicionales se mezclan con la composición que comprende la proteína AnxA5 y un quelante de iones metálicos de calcio antes de someterse a la composición de una resina de intercambio aniónico. Las soluciones utilizadas en las siguientes etapas de intercambio aniónico (por ejemplo, soluciones de lavado y/o tampones de elución) pueden o no incluir también los iones metálicos seleccionados adicionales. Por lo tanto, en una opción preferida de esta realización del primer aspecto de la invención, la etapa de
- 40 realizar la etapa de intercambio aniónico en presencia de iones metálicos seleccionados adicionales se refiere a la adición de los iones metálicos seleccionados adicionales a la composición que comprende la proteína AnxA5 y un quelante de iones metálicos de calcio antes de someterse a la composición de una resina de intercambio aniónico.

- 45 De acuerdo con la tercera realización preferida del primer aspecto de la presente invención, el quelante de iones metálicos de calcio puede seleccionarse preferiblemente de EDTA o una sal del mismo, EGTA o una sal del mismo, y más preferentemente EDTA.

- El quelante de iones metálicos calcio puede estar presente en la composición en exceso y/o en una concentración en el rango de aproximadamente 0,1 mM a 500 mM, tal como de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, más normalmente en el rango de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente, o al menos, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM o más. En este contexto, el término "aproximadamente" puede incluir el significado de  $\pm$  0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 mM del valor establecido. En el anterior contexto, el término "exceso" puede incluir el significado de que una cantidad suficiente de quelante de iones metálicos de calcio está presente para eliminar cualquier ión divalente que pueda contribuir a la unión de la proteína AnxA5 a la heparina inmovilizada en la columna en una etapa anterior de cromatografía de
- 55 afinidad, permitiendo así que la proteína AnxA5 sea liberada de la columna a la solución, y luego utilizada directa o indirectamente en la etapa de pulido por intercambio aniónico.

En una opción a modo de ejemplo de acuerdo con la tercera realización preferida del primer aspecto de la presente invención, los iones metálicos seleccionados son cationes divalentes, tales como iones  $Mg^{2+}$ .

- Se puede preferir que los iones metálicos seleccionados estén presentes durante la etapa de intercambio aniónico en una cantidad eficaz para reducir (por ejemplo, en aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90%, 95 %, 98 %, 99 % o más) o evitar una interacción entre el quelante de iones de calcio y la resina de intercambio aniónico durante el procedimiento de someter la composición a la resina de intercambio aniónico. Por ejemplo, los iones metálicos seleccionados pueden estar presentes durante la etapa de intercambio aniónico en una cantidad eficaz para reducir o evitar una interacción entre el quelante de iones de calcio y la resina de intercambio aniónico durante la carga de la composición sobre la resina de intercambio aniónico y/o durante una o más etapas de lavado en las que la proteína AnxA5 se une a la resina de intercambio aniónico y las impurezas se eliminan mediante lavado.
- Puede ser preferible que los iones metálicos seleccionados estén presentes durante la etapa de intercambio aniónico en una cantidad eficaz para aumentar la unión de la proteína AnxA5 a la resina de intercambio aniónico en presencia del quelante de iones de calcio y, por lo tanto reducir (tal como en aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más) la pérdida de proteína AnxA5 en el flujo a través de la etapa de intercambio aniónico, en comparación con el nivel de pérdida observado cuando no hay iones metálicos seleccionados presentes durante la etapa de intercambio aniónico.
- Puede ser preferible que los iones metálicos seleccionados estén presentes durante la etapa de intercambio aniónico en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mM, tal como de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mM o de aproximadamente 12,5 mM.
- Además, puede ser preferible que el quelante de iones metálicos de calcio sea el EDTA y los iones metálicos seleccionados sean iones  $Mg^{2+}$ , y más preferentemente la relación molar de iones  $Mg^{2+}$  a EDTA está en el rango de 0,5:1 a 2:1, más preferentemente al menos 1:1 o  $> 1:1$ .
- En el contexto de la tercera realización preferida del primer aspecto de la presente invención, en una opción adicional, la composición que comprende la proteína AnxA5 y un quelante de iones metálicos de calcio y que se somete a la resina de intercambio aniónico puede ser el producto directo o indirecto de un procedimiento anterior que comprende la etapa de someter la proteína AnxA5 a una etapa de cromatografía de afinidad y eluir la proteína AnxA5 con un quelante de iones de calcio, produciendo así un producto de cromatografía de afinidad que es una composición que comprende la proteína AnxA5 y un quelante de iones metálicos de calcio. Por ejemplo, la etapa de cromatografía de afinidad precedente puede comprender la unión de la proteína AnxA5 a heparina inmovilizada, opcionalmente en la que la unión se promueve mediante la presencia de iones de calcio, y también opcionalmente en la que la proteína AnxA5 se eluye de la heparina inmovilizada usando un tampón de elución que contiene un quelante de iones de calcio, tal como el EDTA.
- Además, puede ser preferible que no haya una etapa de diálisis entre la etapa de cromatografía de afinidad precedente y la etapa de intercambio de aniones y/o que no haya eliminación del quelante de iones de calcio del producto de la etapa de cromatografía de afinidad precedente antes de la aplicación del producto directo o indirecto a la etapa de intercambio aniónico.
- En el contexto de la tercera realización preferida del primer aspecto de la presente invención, en una opción adicional, los iones metálicos seleccionados se añaden a la composición antes o durante la etapa de intercambio aniónico.
- En una opción preferida, el producto de una etapa de cromatografía de afinidad de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención (que incluye una etapa de cromatografía de afinidad de acuerdo con la primera y/o segunda realizaciones del primer aspecto de la presente invención) se trata con una etapa de intercambio aniónico adicional, tal como una etapa de intercambio aniónico de acuerdo con la tercera realización preferida del primer aspecto de la presente invención.
- Opcionalmente, antes de la (segunda) etapa de pulido por intercambio aniónico, se ajusta o se ajustan uno o más parámetros del entorno de la proteína AnxA5 liberada, seleccionados del grupo que consiste en la concentración de la proteína AnxA5, el pH, la conductividad, el nivel del quelante de iones de calcio y el nivel de detergente no iónico, o el nivel de iones metálicos seleccionados adicionales (de acuerdo con la tercera realización preferida del primer aspecto de la presente invención).
- Normalmente, antes de la puesta en contacto de la (segunda) resina de intercambio aniónico de la etapa de pulido y el producto AnxA5, la resina de intercambio aniónico se equilibra. Se puede usar cualquier equilibrio adecuado. Por ejemplo, la resina de intercambio aniónico se puede equilibrar con un tampón (por ejemplo, Tris 20 mM, pH 7,4), un detergente no iónico (por ejemplo, polisorbato al 0,1 %, preferentemente Tween80) y sal (por ejemplo, 25 mM NaCl). Se puede usar cualquier volumen de equilibrado adecuado; sin limitación, el solicitante ha descubierto que 3 volúmenes de columna (VC) son un volumen adecuado en el procedimiento ejemplificado.
- Preferentemente, la (segunda) etapa de pulido por intercambio aniónico se ejecuta en modo positivo con respecto a la proteína AnxA5, de modo que la proteína AnxA5 se une temporalmente al intercambiador aniónico durante la etapa de intercambio aniónico, normalmente se pasa una solución de lavado sobre la columna para eliminar las impurezas de la proteína AnxA5 unida y, a continuación, se produce el segundo producto de intercambio aniónico

que comprende la proteína AnxA5 liberada aplicando un tampón de elución a la resina de intercambio aniónico para liberar la proteína AnxA5 unida.

5 Son preferidas las resinas de intercambio aniónico fuertes. Las resinas de intercambio aniónico fuertes son bien conocidas en la técnica, y los ejemplos incluyen resinas con un grupo funcional de amonio cuaternario, tal como una resina de Tipo I que tiene cloruro o hidróxido de trialkilamonio, o resinas de Tipo II que tienen cloruro o hidróxido de dialquil 2-hidroxietil amonio. Sin limitación, un ejemplo de una resina de intercambio aniónico adecuada para la segunda etapa de pulido incluye Source15 Q. Una resina de intercambio aniónico Source 15Q puede definirse como un intercambiador polimérico de aniones fuerte y puede caracterizarse además por tener un ligando de amonio cuaternario, alrededor de 15 µm de tamaño medio de partícula de la distribución de volumen acumulado ( $d_{50v}$ ), una matriz de poliestireno/divinilbenceno, y/o una especificación de presión/flujo de aproximadamente 400 cm/h, 1000 kPa, cuando se evalúa como una columna FineLine 100 con una altura de lecho de 10 cm.

10 Sin limitación, otro ejemplo de una resina de intercambio aniónico adecuada para la segunda etapa de pulido incluye Capto Q ImpRes. Un Capto Q ImpRes se puede definir como un intercambiador de aniones fuerte y se puede caracterizar además por tener un ligando de amina cuaternaria, una matriz de agarosa de alto flujo, aproximadamente un tamaño medio de partícula de 36-44 µm ( $d_{50v}$ ), una capacidad iónica de aproximadamente 0,15-0,18 mmol Cl<sup>-</sup>/ ml medio, una capacidad de unión/ml del medio de cromatografía de > 55 mg de BSA y > 48 mg de β-lactoglobulina y/o una especificación de presión/flujo de aproximadamente 300 kPa at min. 220 cm/h, cuando se evalúa como una columna de 1 m de diámetro con una altura de lecho de 20 cm.

20 Sin estar ligado a teoría alguna, el solicitante ha descubierto que el uso de la resina de intercambio aniónico Capto Q ImpRes para la (segunda) etapa de pulido por intercambio aniónico puede ser particularmente ventajoso cuando la proteína AnxA5 que se va a purificar se deriva de una fuente recombinante (como *E. coli* BL21 (DE3) que está diseñada para la sobreexpresión de PGL, tal como se describe en Aon y col. (Appl. Env. Microbiol., 2008, 74(4): 950-958) que no causa niveles, o causa niveles bajos, de gluconoilación de la proteína AnxA5 que expresa. El término “bajo” en ese contexto puede incluir el significado de que el nivel de gluconoilación es inferior (tal como menos del 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %) al nivel de gluconoilación de una proteína AnxA5 que se expresa en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (por ejemplo, tal como se encuentra ampliamente disponible en el mercado y se describe en Marder y col., 2014, BMC Biotechnology, 14:33). Por ejemplo, es posible que el nivel de proteína AnxA5 gluconoilada en el producto que se aplica a la resina de intercambio aniónico Capto Q ImpRes para la (segunda) etapa de pulido por intercambio aniónico esté dentro del rango de 0,5 a 30 %, o de 0,5 a 20 %, o de 0,5 a 15 %, o de 0,5 a 10 % del contenido total de proteína AnxA5 en el producto que se aplica. Las variantes gluconiladas de Anx5 pueden, por ejemplo, medirse y cuantificarse utilizando los instrumentos cromatográficos de cromatografía líquida de alta eficacia (UPLC) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleando columnas de intercambio aniónico o de fase inversa apropiadas. Diferentes picos se pueden identificar y caracterizar aún más mediante el uso de espectroscopía de masas (EM).

35 El solicitante ha descubierto que el uso de la resina de intercambio aniónico Capto Q ImpRes para la (segunda) etapa de pulido por intercambio aniónico cuando la proteína AnxA5 que se va a purificar no tiene, o tiene niveles bajos de, gluconoilación, da como resultado un procedimiento aún más eficaz (en comparación con el uso de la resina de intercambio aniónico Source 15Q para la (segunda) etapa de pulido por intercambio aniónico), ya que la resina de intercambio aniónico Capto Q ImpRes tiene una alta capacidad de unión, tolera altos caudales sin contrapresión, se puede empaquetar a una altura de lecho más alta y tiene un precio más bajo. La calidad y la pureza del producto final se mantienen independientemente de si se usa la resina de intercambio aniónico Source 15Q o Capto Q ImpRes. Sin embargo, se estima que el cambio de la resina de intercambio aniónico Source 15Q (con un tamaño de partícula de 15 µm) a la resina de intercambio aniónico Capto Q ImpRes (con un diámetro de partícula de 40 µm) proporciona un aumento de productividad que puede ser más de aproximadamente cinco veces (5x) al reducir el tiempo necesario para operar todo el procedimiento (especialmente porque la segunda etapa de intercambio aniónico utilizada para el pulido es una de las etapas que más tiempo emplea) y puede reducir el coste total de fabricación en más de un 50 %. El hecho de evitar la resina con un tamaño de esfera muy pequeño (<30 µm) permite altos caudales y permite que la columna de cromatografía se rellene a una mayor altura de lecho de resina sin provocar una contrapresión inaceptable. Esto aumenta la productividad ya que, para una huella dada (diámetro de columna), se puede empaquetar más resina en la columna y, por lo tanto, se pueden unir más proteínas y, al mismo tiempo, permite un funcionamiento más rápido debido a mayores caudales.

45 Después de la carga en la (segunda) resina de intercambio aniónico para el pulido, en modo positivo, la proteína AnxA5 se une temporalmente a la resina y se puede lavar para reducir/eliminar las impurezas. Se pueden emplear cualesquiera condiciones de lavado adecuadas. Por ejemplo, la solución de lavado puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, una solución acuosa de un tampón (por ejemplo, Bis-20 mM Tris, pH 7) y sal (por ejemplo, 25 mM NaCl) y, opcionalmente, un tampón no iónico (por ejemplo, un polisorbato, preferentemente Tween80, tal como a un nivel de aproximadamente 0,1 p/v). Se puede usar cualquier volumen de lavado adecuado; sin limitación, el solicitante ha descubierto que 3 volúmenes de columna (VC) son un volumen adecuado en el procedimiento ejemplificado.

60 La proteína AnxA5 unida se libera luego de la resina de intercambio aniónico utilizando un tampón de elución. Se puede emplear cualquier tampón de elución adecuado. Por ejemplo, el tampón de elución puede comprender,

consistir esencialmente en, o consistir en, una solución acuosa de un tampón (por ejemplo, Bis-Tris 20 mM, pH 7), sal a una concentración mayor que la solución de lavado (por ejemplo, 180 mM NaCl, opcionalmente  $\pm$  100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 o 5 mM) y, opcionalmente, un tampón no iónico (por ejemplo, un polisorbato, preferentemente Tween80, tal como a un nivel de aproximadamente 0,1 p/v). Se puede usar cualquier volumen de elución adecuado; sin limitación, el solicitante ha descubierto que 33 volúmenes de columna (VC), que aumentan la concentración del tampón de elución de 0 a 100 % en un gradiente lineal, son adecuados para la elución en el procedimiento ejemplificado.

Por consiguiente, la proteína AnxA5 se libera en el tampón de elución, y esto proporciona el (segundo) producto de intercambio aniónico pulido. Tal como se explica en el Ejemplo 1, un procedimiento realizado con Tween80 al 0,1 % aumentó el rendimiento del producto postintermedio en aproximadamente un 30 %.

La (segunda) resina de intercambio aniónico puede entonces regenerarse y limpiarse. Los procedimientos adecuados para la regeneración y limpieza son conocidos en la técnica, y uno de tales protocolos adecuados se describe en los ejemplos.

La etapa de pulido se implementa principalmente para la reducción de impurezas relacionadas con el producto, por ejemplo, la separación de diferentes isoformas de anexina A5. Además, la etapa de pulido alcanza el factor de agotamiento más alto en el procedimiento para el ADN residual y reduce en gran medida la PCH. La endotoxina, que ya se encuentra en un nivel bajo después de la etapa intermedia, se reduce aún más, en aproximadamente un 99 %, lo que (cuando se usa en combinación con la homogeneización celular anterior, el tratamiento con nucleasas, el aclarado, el intercambio aniónico de captura, la filtración (tal como una etapa de filtración estéril), y las etapas de afinidad con heparina) lleva los niveles de endotoxinas a aproximadamente el 0,0003 % de los niveles en el producto aclarado antes de la primera etapa de AX.

Por consiguiente, en una realización adicional del primer aspecto de la presente invención (opcionalmente, incluyendo las realizaciones primera, segunda y/o tercera del primer aspecto de la presente invención), se proporciona un procedimiento para la recuperación y/o purificación de una proteína intracelular expresada de forma recombinante que comprende la secuencia de anexina A5 (AnxA5) de una célula huésped con una pared celular, o un cultivo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención y preferentemente en el que el procedimiento comprende la recuperación y/o purificación de una proteína AnxA5 intracelular expresada de forma recombinante de un cultivo de células huésped, y en el que el cultivo tiene un volumen de al menos aproximadamente 100 L, aproximadamente 200 L, aproximadamente 300L, aproximadamente 400 L, aproximadamente 500 L, aproximadamente 600 L, aproximadamente 700 L, aproximadamente 800 L, aproximadamente 900 L, aproximadamente 1.000 L, aproximadamente 2.000 L, aproximadamente 3.000 L, aproximadamente 4.000 L, aproximadamente 5.000 L, aproximadamente 6.000 L, aproximadamente 7.0000 L, aproximadamente 8.0000 L, aproximadamente 9.0000 L, aproximadamente 10.000 L, aproximadamente 20.000 L, aproximadamente 30.000 L, aproximadamente 40.000 L, aproximadamente 50.000 L, un aproximadamente 60.000L, aproximadamente 70.0000 L, aproximadamente 80.0000 L, aproximadamente 90.0000 L, aproximadamente 100.000 L o más, en el que:

(a) el procedimiento comprende liberar la proteína intracelular de la célula huésped en presencia de un tampón de homogeneización que comprende un detergente no iónico de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención;

(b) opcionalmente, en el que la etapa de liberación está de acuerdo con una o más de las realizaciones y/u opciones del primer aspecto de la presente invención tal como se describe anteriormente en la subsección C;

(c) además, opcionalmente, en el que el procedimiento comprende una etapa de aclarado del homogeneizado de biomasa de acuerdo con una o más de las realizaciones y/u opciones tal como se describe anteriormente en la subsección D; y

(d) el procedimiento comprende además la etapa de someter la proteína AnxA5 liberada directa o indirectamente a una resina de intercambio aniónico para realizar una primera etapa de intercambio aniónico, y producir así un primer producto de intercambio aniónico que comprende la proteína AnxA5 liberada de acuerdo con cualquiera de una o más de las realizaciones y/u opciones descritas anteriormente en la subsección E; y

(e) el procedimiento comprende además la etapa de someter la proteína AnxA5 liberada directa o indirectamente a una etapa de cromatografía de afinidad, de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención (opcionalmente, incluyendo la primera y/o segunda realizaciones del primer aspecto) de la presente invención y/u de las opciones del mismo, tal como se describe anteriormente en la sección F, y

(f) el producto de la etapa de cromatografía de afinidad es una composición que comprende la proteína AnxA5 y un quelante de iones metálicos de calcio; y

(g) el producto directo o indirecto de la etapa de cromatografía de afinidad que comprende la proteína AnxA5 y el quelante de iones metálicos de calcio se somete a una etapa de intercambio aniónico de acuerdo con cualquiera de las realizaciones y/u opciones descritas anteriormente en esta sección (es decir, la sección G).

## H. Formulación del producto

El procedimiento de cualquiera de los primeros aspectos de la presente invención (opcionalmente, incluyendo las realizaciones primera, segunda y/o tercera del primer aspecto de la presente invención) puede, además,



comprender, preferentemente al final del procedimiento, una o más etapas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en concentración, cambio de tampón, acondicionamiento y filtración (tal como una etapa de filtración estéril) y, opcionalmente, una etapa final de almacenamiento del producto que contiene la proteína AnxA5 en un recipiente estéril.

- 5 Por ejemplo, una de las etapas adicionales utilizadas para la formulación del producto puede ser la ultrafiltración/diafiltración (UF/DF), en la que, opcionalmente, el producto de la etapa UF/DF contiene la proteína AnxA5 en una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL, 10 mg/mL, 11 mg/mL, 12 mg/mL, 13 mg/mL, 14 mg/mL, 15 mg/mL, 16 mg/mL, 17 mg/mL, 18 mg/mL, 19 mg/mL, 20 mg/mL, 25 mg/mL, 30 mg/mL, 35 mg/mL, 40 mg/mL, 45 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL, 100 mg/mL, 125 mg/mL o más.

En otro ejemplo, una de las etapas adicionales utilizadas para la formulación del producto puede ser la adición de un tensioactivo no iónico, preferentemente un polisorbato, y más preferentemente Tween80. El tensioactivo no iónico se puede añadir en una cantidad deseada para el producto final, tal como a una concentración final de aproximadamente 0,05 % (p/p) (por ejemplo,  $\pm$  0,05, 0,04, 0,03, 0,02 o 0,01 % p/v).

- 15 En otro ejemplo, una de las etapas adicionales utilizadas para la formulación del producto puede ser una etapa de filtración (tal como una etapa de filtración estéril), por ejemplo, utilizando un filtro de 0,45-0,2  $\mu$ m o un filtro de 0,22  $\mu$ m.

- Como se indicó anteriormente, el procedimiento del primer aspecto de la presente invención (opcionalmente, incluyendo la primera, segunda y/o tercera realización del primer aspecto de la presente invención) puede concluir con la etapa de filtración estéril y la colocación del producto que contiene la proteína AnxA5 filtrada estéril en un recipiente estéril.

La concentración final de la proteína AnxA5 en el recipiente lleno puede ajustarse según se requiera. Sin limitación, el solicitante ha ejemplificado una concentración final de 10 mg/mL. Una concentración adecuada puede ser, por ejemplo, 1-125 mg/mL, 2-100 mg/mL, 5-50 mg/mL, 7-30 mg/mL o aproximadamente 10-20 mg/mL.

- 25 Opcionalmente, los procedimientos de la presente invención pueden proporcionar un producto de proteína AnxA5 estéril final en un tampón sin fosfato (tal como tampón Bis-Tris o Tris) a un pH de aproximadamente 7,4 (por ejemplo,  $\pm$  0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 unidades de pH), que comprende aproximadamente 150 mM de NaCl (por ejemplo,  $\pm$  50, 40, 30, 20 o 10 mM), aproximadamente 1 mM de CaCl<sub>2</sub> (por ejemplo,  $\pm$  500, 400, 300, 200, 100 o 50  $\mu$ M), aproximadamente 0,05 % (p/p) (por ejemplo,  $\pm$  0,05, 0,04, 0,03, 0,02 o 0,01 % p/v) de polisorbato, tal como Tween80 u otro detergente no iónico. Un pH de aproximadamente 7,4 es un pH objetivo típico para formulaciones destinadas al uso en humanos (especialmente para administración intravenosa), ya que coincide con el pH de la sangre humana y proporciona una proteína AnxA5 estable con buena solubilidad. Por debajo de pH 7, y particularmente hasta alrededor de pH 6, la proteína AnxA5 pierde solubilidad y puede comenzar a precipitar.

- 35 El NaCl puede ser útil para mantener el producto AnxA5 en forma monomérica durante el almacenamiento. Por consiguiente, los procedimientos de la presente invención pueden proporcionar un producto de proteína AnxA5 estéril final, en el que la concentración de NaCl presente mantiene la proteína AnxA5 en una forma que es predominantemente (es decir, más de aproximadamente el 50 %, tal como el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o sustancialmente el 100 %) monomérica. Los niveles de monómero en porcentaje se pueden determinar fácilmente usando técnicas bien conocidas en la técnica, tales como la cromatografía de permeación en gel (GPC).

- 45 Opcionalmente, los procedimientos de la presente invención proporcionan un producto de proteína AnxA5 final estéril y terapéuticamente aceptable, con un rendimiento global de más de 1 g de proteína AnxA5 por L de cultivo de la célula huésped, más preferentemente al menos aproximadamente 1,5 g/L, incluso más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 g/L. En ese contexto, el término "aproximadamente" puede incluir  $\pm$  0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 g/L del valor establecido.

- 50 Opcionalmente, los procedimientos de la presente invención proporcionan un producto de proteína AnxA5 final estéril y terapéuticamente aceptable, con una recuperación global de la proteína AnxA5 de al menos aproximadamente el 24 % en peso (por ejemplo,  $\pm$  10, 9, 8, 7, 6, 5, 5, 4, 3, 2, 1 %), o más, de la proteína AnxA5 presente en el cultivo de la célula huésped. Esto se puede determinar, por ejemplo, midiendo la proteína AnxA5 soluble en el homogeneizado inicial (que puede capturarse y medirse por centrifugación de una parte alícuota del homogeneizado y analizando el nivel de AnxA5 en el sobrenadante) y en el producto purificado final.

- Además, en cualquier punto del procedimiento (si es relevante, antes de llenar el recipiente estéril), y normalmente después de la etapa de purificación final tal como se describe anteriormente, la proteína AnxA5 puede modificarse químicamente. Por ejemplo, la proteína AnxA5 puede PEGilarse. La anexina A5 PEGilada se desvela en el documento WO 02/067857. La PEGilación es un procedimiento bien conocido por los expertos en la materia, en el que un polipéptido o compuesto peptidomimético (para los fines de la presente invención, la proteína AnxA5) se modifica de forma que una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) se unen de forma covalente a la cadena lateral de uno o más aminoácidos o derivados de los mismos. Esta es una de las técnicas de química estructural para la

modificación de moléculas (QEMP) más importantes. Pueden utilizarse otras técnicas QEMP; tales técnicas pueden mejorar las propiedades farmacodinámicas de la molécula, por ejemplo, extendiendo su semivida *in vivo*. Se forma un conjugado de proteína PEG activando primero la fracción de PEG para que reaccione con, y se acople a, la proteína o el compuesto peptidomimético. Las fracciones de PEG varían de forma considerable en peso molecular y conformación, siendo las fracciones iniciales (los PEG monofuncionales; los PEGm) lineales y con pesos moleculares de 12 kDa o menos, y teniendo las últimas fracciones pesos moleculares mayores. PEG2, una innovación reciente de la tecnología PEG, implica el acoplamiento de un PEGm de 30 kDa (o menos) a un aminoácido lisina (aunque la PEGilación puede ampliarse a la adición de PEG a otros aminoácidos), que se hace reaccionar adicionalmente para formar una estructura ramificada que se comporta como un PEGm lineal de un peso molecular mucho mayor (Kozłowski y col., 2001). Los procedimientos que se pueden utilizar para unir de forma covalente las moléculas de PEG a polipéptidos se describen con más detalle en Roberts y col. (2002) *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 459 - 476; Bhadra y col. (2002) *Pharmazie* 57, 5 - 29; Kozłowski y col. (2001) *J Control Release* 72, 217 - 224; y Veronese (2001) *Biomaterials* 22, 405 - 417 y las referencias a las que allí se hace referencia. Las ventajas de la PEGilación incluyen el aclaramiento renal reducido que, para algunos productos, da como resultado una absorción más sostenida tras la administración, así como una distribución restringida, lo que posiblemente conduce a concentraciones plasmáticas más constantes y sostenidas y, por lo tanto, a un aumento de la eficacia clínica (Harris y col. (2001) *Clin Pharmacokinet* 40, 539 - 551). Otras ventajas pueden incluir la inmunogenicidad reducida del compuesto terapéutico (Reddy (2001) *Ann Pharmacother*, 34, 915 - 923) y una menor toxicidad (Kozłowski y col. (2001), *Biodrugs* 15, 419 - 429). En el caso de que la proteína AnxA5 se modifique químicamente, puede ser conveniente realizar una o más etapas de purificación adicionales, como reducir o eliminar componentes sin reaccionar y/o seleccionar una población homogénea de proteína AnxA5 modificada químicamente para su inclusión en el producto final. Los expertos en la materia conocen la técnica adecuada para la purificación de proteínas modificadas químicamente a partir del procedimiento de reacción.

El producto final puede ser, o puede formularse posteriormente para formar, una composición farmacéutica o veterinaria.

El producto final se puede presentar en forma de dosificación unitaria. Por ejemplo, una forma de dosificación unitaria puede contener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg de la proteína AnxA5 (en donde el término "aproximadamente" se refiere a  $\pm 0,5$ , 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 mg) o más, por ejemplo, dentro del rango de 0,1 a 1000 mg, o de 1 a 100 mg.

Una composición farmacéutica o veterinaria puede comprender la proteína AnxA5 en mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable, que normalmente se seleccionará en función de la vía de administración prevista y de la práctica farmacéutica estándar. La composición puede estar en forma de aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada. Preferentemente, la formulación es una dosis unitaria que contiene una dosis o unidad diaria, una subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente activo.

Las frases "farmacéutica o veterinariamente aceptable" incluyen referencias a composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción no deseable cuando se administran a un animal o un ser humano, según corresponda. La preparación de tales composiciones farmacéuticas o veterinarias es conocida por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, tal como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para la administración a animales o humanos, se entenderá que las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza que requiere la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

Tal como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente o veterinariamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, sales, conservantes, medicamentos, estabilizadores de fármacos, excipientes, agentes de desintegración, tales como materiales y combinaciones de los mismos, según sería conocido por un experto en la materia. Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas o veterinarias de acuerdo con la invención pueden, o no, estar destinadas a y, por tanto, formularse de una manera adecuada para, administración parenteral, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intraocular, intracraneal, intra-cerebral, intraósea, intracerebroventricular, intratecal o subcutánea, mediante administración desde un stent liberador de fármacos, para administración mediante técnicas de infusión, o para administración tópica (tal como en una forma adecuada para epicutánea, por ejemplo, a modo de crema o ungüento, inhalación, gotas oftálmicas/oculares, gotas óticas/auditivas, o a través de las membranas mucosas del cuerpo). Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización. Las composiciones farmacéuticas se pueden usar mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer que la solución sea isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas pueden tamponarse adecuadamente (preferentemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones farmacéuticas adecuadas en

condiciones estériles se realiza fácilmente mediante técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por los expertos en la materia.

De manera alternativa, las composiciones farmacéuticas o veterinarias de acuerdo con la invención pueden formularse en forma de polvo, tal como un polvo estéril, que puede ser un polvo liofilizado.

- 5 Una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína AnxA5 para su administración a un paciente, tal como un paciente humano, sobre la base de un nivel de dosificación diaria, puede ser de 0,01 a 1000 mg de proteína AnxA5 por adulto (por ejemplo, de aproximadamente 0,001 a 20 mg por kg de peso corporal del paciente, tal como de 0,01 a 10 mg/kg, por ejemplo, más de 0,1 mg/kg y hasta o menos de 20, 10, 5, 4, 3 o 2 mg/kg, tal como aproximadamente 1 mg/kg), administrados en dosis únicas o divididas.
- 10 En cualquier caso, el médico determinará la dosis real que será más adecuada para cualquier paciente individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente en particular. Las dosificaciones anteriores son ejemplares del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se necesiten rangos de dosificación mayores o menores y tales están dentro del alcance de esta invención.
- 15 Para uso veterinario, se administra un compuesto de la invención como una formulación adecuadamente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal y el veterinario determinará el régimen de dosificación y la vía de administración más apropiada para un animal en particular.

### I. Características del producto

20 Los procedimientos de la presente invención proporcionan un producto AnxA5 tal como se ha definido anteriormente. Como tal, el producto producido mediante el procedimiento reivindicado es también un segundo aspecto adicional de la presente invención, tal como se define adicionalmente en la reivindicación 18.

25 Opcionalmente, el procedimiento de la presente invención puede proporcionar un producto que comprende la proteína AnxA5 con una pureza adecuada para productos farmacéuticos inyectables para uso en seres humanos. El procedimiento descrito en el presente documento generalmente elimina las impurezas relacionadas con el procedimiento muy por debajo de los niveles aceptables, como la proteína de la célula huésped por debajo de 20 ng por mg de proteína AnxA5, el ADN por debajo de 10 pg por mg de proteína AnxA5 y las endotoxinas por debajo de 1 UE por mg de proteína AnxA5.

30 Opcionalmente, el procedimiento de la presente invención puede proporcionar un producto que comprende proteína no AnxA5, en particular proteína de la célula huésped (distinta de la proteína AnxA5 expresada de forma recombinante), a un nivel inferior a 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 ng o menos por mg de proteína AnxA5. La FDA y la EMA esperan que la proteína de la célula huésped sea inferior a 100 ng/mg y el solicitante ha demostrado una proteína de la célula huésped inferior a 20 ng/mg. El contenido de proteína de la célula huésped puede medirse, por ejemplo, utilizando anticuerpos de proteína de la célula huésped mediante técnicas ELISA sándwich u otros procedimientos aceptados por la EMA y la FDA.

35 Opcionalmente, el procedimiento de la presente invención puede proporcionar un producto que comprende un contenido de endotoxinas inferior a 100, 90, 80, 70, 60, 50 45, 40, 35, 30, 35, 20, 15, y preferentemente inferior a 10, 5 o 1 EU por mg de proteína AnxA5, y/o preferentemente en el que el procedimiento proporciona un producto en forma de dosificación unitaria y el producto contiene menos de 100, 90, 80, 70, 60, 50 45, 40, 35, 30, 35, 20, 15, y preferentemente menos de 10, 5 o 1 UE por dosis unitaria. La FDA y la EMA esperan que las endotoxinas sean menos de 100 EU/dosis (el máximo permitido es de 350 EU/dosis); la cantidad esperada se traduce en menos de 10 EU/mg en una dosis de 10 mg. Dentro de estos parámetros, la forma de dosificación unitaria puede contener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg de la proteína AnxA5 o más (por ejemplo, dentro del rango de 0,1 a 1000 mg, o 1 a 100 mg). Las endotoxinas se pueden medir, por ejemplo, utilizando técnicas de base LAL u otros procedimientos aceptados por la EMA y la FDA.

45 Opcionalmente, el procedimiento de la presente invención puede proporcionar un producto que comprende niveles de ácido nucleico (por ejemplo, ADN), tales como niveles de ácido nucleico de la célula huésped (por ejemplo, ADN), de menos de 1.000 pg por mg de proteína AnxA5, preferentemente de menos de 500 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 400 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 300 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 200 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 100 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 50 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 40 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 30 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 20 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 15 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 10 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 9 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 8 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 7 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 6 pg por mg de proteína AnxA5, de menos de 5 pg por mg de proteína AnxA5, tal como aproximadamente de 4 pg por mg de proteína AnxA5. El ADN puede medirse, por ejemplo, utilizando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RCPC) u otros métodos aceptados por la EMA y la FDA.

55 En una opción particularmente preferida, el procedimiento de la presente invención puede proporcionar un producto que tenga una o más características seleccionadas de la lista que consiste en:

- una concentración de proteína AnxA5 generalmente alrededor de 8-12 g/L;
- niveles de proteína de la célula huésped en o por debajo de 100 ng/mg y más preferentemente 20 ng/mg (según determinado por ELISA);
- niveles de ADN de la célula huésped en o por debajo de 100 pg/mg; y más preferentemente 10 pg/mg
- 5 - endotoxina en o por debajo de 35 EU/mg y más preferentemente 1 EU/mg,
- una pureza de > 95 % según determinado por cromatografía de exclusión por tamaño;
- una carga biológica de <1 cfu/mL (según determinado por Ph. Eur. 2.6.12);
- un aspecto claro, incoloro, libre de partículas visibles; y
- 10 - en el que la banda principal detectada por el análisis de transferencia Western corresponde a la referencia de la anexina A5.

En una opción adicional particularmente preferida, la proteína AnxA5 en el producto puede tener un bajo nivel de gluconoilación. El término "bajo" en ese contexto puede incluir entonces el significado de que el nivel de gluconoilación es inferior (tal como menos del 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %,  
15 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %) al nivel de gluconoilación de una proteína AnxA5 que se expresa en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (por ejemplo, tal como se encuentra ampliamente disponible en el mercado y se describe en Marder y col., 2014, BMC Biotechnology, 14:33). Por ejemplo, es posible que el nivel de proteína AnxA5 gluconoilada en el producto esté dentro del rango de 0,5 a 30 %, o de 0,5 a 20 %, o de 0,5 a 15 %, o de 0,5 a 10 % del contenido total de proteína AnxA5 en el producto. Dicho de otra manera, puede ser que el nivel de proteína AnxA5 gluconoilada en el producto sea inferior al 40 %, tal como inferior al 30 %, 20 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % y, de preferencia, sustancialmente 0 %. Las variantes gluconoiladas de Anx5 pueden, por ejemplo, medirse y cuantificarse utilizando instrumentos de cromatografía UPLC o HPLC, empleando columnas de intercambio aniónico o de fase inversa apropiadas.

Por consiguiente, un segundo aspecto de la presente invención proporciona una composición que comprende una proteína AnxA5, tal como se define adicionalmente en la reivindicación 18. Opcionalmente, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable y/o veterinariamente aceptable.

#### J. Usos médicos y veterinarios

El tercer aspecto de la presente invención también proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para su uso en medicina. Por decirlo de otra manera, la presente solicitud describe un procedimiento que comprende la administración a un ser humano o a un animal que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición del segundo aspecto de la presente invención.

En ciertas realizaciones del tercer aspecto de la presente invención, la composición del segundo aspecto de la presente invención se puede usar:

(a) para la prevención o reducción del riesgo de trombosis (tal como aterotrombosis) y/o rotura de la placa, o para la administración a pacientes pertenecientes a un grupo de riesgo, incluyendo, pero sin limitarse a, pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y/o pacientes que tienen o han tenido (o corren riesgo de tener) una infección del tracto respiratorio superior u otra infección (incluida la infección neumocócica) que puede causar un aumento de los niveles de anticuerpos relacionados con antifosfolípidos, o para tratar (ya sea de manera activa o profiláctica) o reducir el riesgo de tromboembolismo, derrame cerebral hemorrágico o vascular, infarto de miocardio, angina de pecho o claudicación intermitente, angina inestable, otras formas de angina grave o ataques isquémicos transitorios (AIT), por ejemplo, tal como se describe con más detalle en el documento WO 2005/099744;

(b) para el tratamiento, la profilaxis o la reducción del riesgo de disfunción vascular, angina de pecho, cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica, hipertensión sistólica, migraña, diabetes tipo 2 y disfunción eréctil, reducción del dolor isquémico y/o tratamiento de la ruptura de una enfermedad vascular, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 2009/077764;

(c) para la profilaxis o el tratamiento de la reestenosis (en particular, la formación o el engrosamiento de la neointima), o la inflamación vascular, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 2009/103977;

(d) para uso en la inhibición de la actividad de cardiolipina oxidada (CLOx) y para el tratamiento, la prevención y/o la reducción del riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular, una enfermedad autoinmune o una afección inflamatoria, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 2010/069605, incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes enfermedades: enfermedad cardiovascular (ECV), diabetes II, enfermedad de Alzheimer, demencia en general, enfermedades reumáticas, aterosclerosis, hipertensión arterial, afecciones inflamatorias agudas y/o crónicas, infarto de miocardio, síndrome coronario agudo, accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio (AIT), claudicación, angina de pecho, diabetes tipo I, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, miastenia grave, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), artritis que incluye osteoartritis, miopatías inflamatorias idiopáticas (MI), dermatomiositis (DM), polimiositis (PM), miositis por cuerpos de

inclusión, un trastorno alérgico y/o osteoartritis en un mamífero; y

(e) para la prevención y/o reducción de las complicaciones peri o postoperatorias posteriores a la intervención quirúrgica, tales como las complicaciones posteriores a la cirugía vascular, especialmente la cirugía vascular periférica, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 2012/136819.

- 5 En una realización adicional del tercer aspecto de la presente invención, la composición del segundo aspecto de la presente invención se puede usar en un procedimiento profiláctico o terapéutico para tratar, prevenir o reducir el riesgo de trastornos hematológicos, incluyendo, pero sin limitación, anemia de células falciformes.

10 En una realización adicional del tercer aspecto de la presente invención, la composición del segundo aspecto de la presente invención se puede usar en un procedimiento profiláctico o terapéutico para tratar, prevenir o reducir el riesgo de inflamación vascular aguda y crónica, vasculitis primaria o secundaria que incluye, entre otras, la vasculitis con componentes autoinmunes y/o la vasculitis inducida por fármacos. En consecuencia, la presente invención también proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para su uso en un procedimiento profiláctico o terapéutico para tratar, prevenir o reducir el riesgo de vasculitis, incluida la enfermedad de Behçet, vasculitis cutánea, granulomatosis eosinofílica con poliangeitis (GPA), arteritis de células gigantes, granulomatosis con poliangeitis (GPA), vasculitis asociada a inmunoglobulina A (IgA), poliangeitis microscópica (PAM), poliarteritis nodosa (PAN), polimialgia reumática y arteritis de Takayasu. La polimialgia reumática puede ser de particular interés.

20 En una realización adicional del tercer aspecto de la presente invención, la composición del segundo aspecto de la presente invención se puede usar en un procedimiento profiláctico o terapéutico para tratar, prevenir o reducir el riesgo de oclusión de las venas retinianas.

25 En una realización adicional del tercer aspecto de la presente invención, la composición del segundo aspecto de la presente invención se puede usar en un procedimiento profiláctico o terapéutico para (i) prevenir o reducir la velocidad de transmisión de una infección viral; (ii) prevenir o proteger contra una infección viral; o (iii) tratar una infección viral, en un sujeto, en el que la infección viral está causada por un virus seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) un virus capaz de causar fiebre hemorrágica (VFH), y
- (b) un virus que presenta fosfatidilserina (PS), mediando la infección celular y/o la internalización a través de la unión de PS.

30 Por consiguiente, en una realización adicional, la presente invención proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para usar en un procedimiento profiláctico o terapéutico para prevenir o reducir la velocidad de transmisión de una infección viral en un sujeto, en el que la infección viral es causada por un virus capaz de causar fiebre hemorrágica (VFH).

35 En otra realización, la presente invención proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para uso en un procedimiento profiláctico o terapéutico para prevenir o reducir la velocidad de transmisión de una infección viral en un sujeto, en el que la infección viral es causada por un virus que presenta fosfatidilserina (PS), mediando la infección celular y/o la internalización a través de la unión de PS.

40 En otra realización, la presente invención proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para uso en un procedimiento profiláctico o terapéutico para prevenir o proteger contra una infección viral en un sujeto, en el que la infección viral está causada por un virus capaz de causar fiebre hemorrágica (VFH).

En otra realización, la presente invención proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para uso en un procedimiento profiláctico o terapéutico para prevenir o proteger contra una infección viral en un sujeto, en el que la infección viral está causada por un virus que presenta fosfatidilserina (PS), mediando la infección celular y/o la internalización a través de la unión de PS.

45 En otra realización, la presente invención proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para uso en un procedimiento profiláctico o terapéutico para tratar una infección viral en un sujeto, en el que la infección viral está causada por un virus capaz de causar fiebre hemorrágica (VFH).

50 En otra realización, la presente invención proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para usar en un procedimiento profiláctico o terapéutico para tratar una infección viral en un sujeto, en el que la infección viral está causada por un virus que presenta fosfatidilserina (PS), mediando la infección celular y/o la internalización a través de la unión de PS.

55 De acuerdo con una realización adicional de la presente invención, se proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para uso en un procedimiento para tratar a un sujeto infectado o sospechoso de estar infectado con un patógeno capaz de causar fiebre hemorrágica, tal como un virus capaz de causar fiebre hemorrágica (VFH) o una bacteria capaz de causar fiebre hemorrágica (FHB).

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para uso en un procedimiento para tratar a un sujeto que ha estado en contacto con otro sujeto que está infectado o se sospecha que está infectado con un patógeno capaz de causar fiebre hemorrágica, tal como un virus capaz de causar fiebre hemorrágica (VFH) o una bacteria capaz de causar fiebre hemorrágica (FHB).

5 De acuerdo con una realización adicional de la presente invención, se proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para su uso en un procedimiento para tratar a un sujeto que ha estado en contacto con material biológico presente en o producido por otro sujeto que está infectado o se sospecha que está infectado con un patógeno capaz de causar fiebre hemorrágica, tal como un virus capaz de causar fiebre hemorrágica (VFH) o una bacteria capaz de causar fiebre hemorrágica (FHB).

10 De acuerdo con estas realizaciones anteriores de la presente invención, el patógeno capaz de causar fiebre hemorrágica puede ser un VFH.

Las fiebres hemorrágicas virales (FHV) son un grupo diverso de enfermedades animales y humanas que pueden ser causadas por al menos cinco familias distintas de virus de ARN: las familias *Arenaviridae*, *Filoviridae*, *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* y *Rabdoviridae*. Todos los tipos de FHV pueden caracterizarse por fiebre y trastornos hemorrágicos y todos pueden progresar a fiebre alta, shock y muerte en muchos casos.

15

Un sujeto que se sospecha que está infectado con un patógeno capaz de causar fiebre hemorrágica, tal como un virus capaz de causar fiebre hemorrágica (FHV) o una bacteria capaz de causar fiebre hemorrágica (FHB) puede tener antecedentes de haber estado en contacto con la enfermedad (por ejemplo, debido a su empleo como trabajador sanitario o debido a la infección de un miembro de su familia) y/o puede ser un sujeto que muestre uno o más signos o síntomas de infección, antes de la confirmación del diagnóstico.

20

Los signos y síntomas de las FHV incluyen característicamente fiebre y mayor susceptibilidad al sangrado (diátesis hemorrágica). Las manifestaciones de FHV a menudo también incluyen enrojecimiento de la cara y el pecho, pequeñas manchas rojas o púrpuras (petequias), sangrado franco, hinchazón causada por edema, presión arterial baja (hipotensión) y shock. Con frecuencia se presentan malestar general, dolor muscular (mialgia), dolor de cabeza, vómitos y diarrea. La gravedad de los síntomas varía según el tipo de virus, y el "síndrome FHV" (pérdida capilar, diátesis hemorrágica y compromiso circulatorio que conduce al shock) aparece en la mayoría de los pacientes con fiebres hemorrágicas por filovirus (por ejemplo, Ébola y Marburg), CCHF y las fiebres hemorrágicas sudamericanas, y en una pequeña minoría de pacientes con dengue, RVF y fiebre de Lassa.

25

De acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención, la FHV puede ser ébola y el sujeto puede mostrar uno o más síntomas de ébola, tales como los síntomas seleccionados de los síntomas clínicos iniciales, como sudoración excesiva o profusa, aparición de fiebre, mialgia, malestar general y/o escalofríos; y/o síntomas similares a los de la gripe, opcionalmente acompañados por síntomas gastrointestinales; erupción maculopapular, petiquea, hemorragia conjuntival, epistaxis, melena, hematemesis, shock y/o encefalopatía; leucopenia (por ejemplo, asociada con aumento de la apoptosis de células linfoides), trombocitopenia, aumento de los niveles de aminotransferasa, trombina y/o trombotoplastina parcial, productos de fibrina dividida detectables en la sangre y/o coagulación intravascular diseminada (CID).

30

35

El diagnóstico definitivo generalmente se realiza en un laboratorio de referencia con capacidades avanzadas de biocontención. Los hallazgos de la investigación de laboratorio varían algo entre los virus, pero, en general, hay una disminución en el recuento total de glóbulos blancos (en particular los linfocitos), una disminución en el recuento de plaquetas, un aumento en las enzimas hepáticas en el suero sanguíneo y una capacidad de coagulación sanguínea reducida, medida como un aumento tanto de la protrombina (PT) como de los tiempos parciales de trombotoplastina activados (TPT). El hematocrito puede estar elevado. La urea sérica y la creatina pueden elevarse, pero esto depende del estado de hidratación del paciente. El tiempo de sangrado tiende a ser prolongado.

40

Por ejemplo, al ser un agente BSL-4, el diagnóstico clínico de viremia confirmado durante la fase aguda de la infección por el virus del ébola es posible con instalaciones de laboratorio adecuadas. Los ensayos que pueden utilizarse se basan en la etapa de la enfermedad.

45

Durante la enfermedad aguda, las pruebas incluyen a) aislamiento de virus utilizando líneas celulares Vero o Vero E6, b) RT-PCR y ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real con controles falsos negativos y falsos positivos apropiados, c) ELISA de captura de antígeno y d) ELISA de IgM.

50

Más adelante, durante el curso de la enfermedad, las pruebas que pueden utilizarse incluyen a) ELISA de IgM e IgG utilizando antígenos víricos auténticos, y en caso de muerte, se pueden utilizar los tejidos de autopsia para a) detección de antígenos utilizando técnicas de inmunotinción, b) detección inmunohistoquímica asistida del antígeno del Ébola (Zaki y col., *J Infect Dis*, 1999;179 (Suppl. 1):S36e47), y c) técnicas de hibridación *in situ* para la detección de ARN viral.

55

Los detalles de cada una de estas técnicas se han resumido en Saijo y col. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 444e51.

El ensayo basado en ELISA ha sido estandarizado por los CDC para la detección de anticuerpos específicos contra

el virus del ébola. El ensayo tiene una alta sensibilidad y se ha demostrado que es capaz de detectar anticuerpos en los sueros de humanos expuestos 10 años antes al ébola. También se han desarrollado un ensayo de placa basado en células y un ensayo de titulación de punto final (DICT50) para detectar y cuantificar los filovirus para su uso en estudios preclínicos (Shurtleff y col., *Viruses* 2012; 4: 3511e30; Smither y col., *J Virol Methods* 2013; 193: 565e71).

- 5 Por ejemplo, el VFH puede ser un virus de una familia seleccionada entre *Filoviridae*, *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Flaviviridae* o *Rhabdoviridae*.

La familia *Arenaviridae* incluye los virus responsables de la fiebre de Lassa, el virus de Lujo, las fiebres hemorrágicas argentinas, bolivianas, brasileñas y venezolanas.

- 10 La familia *Bunyaviridae* incluye miembros del género Hantavirus que causan la fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR), el virus de la fiebre hemorrágica Crimea-Congo (FHCC) del género Nairovirus, el virus Garissa y el virus Ilesha del virus Orthobunyav y la fiebre del Valle del Rift (RVF) virus del género phlebovirus.

La familia *Filoviridae* incluye el virus del ébola y el virus Marburg.

La familia *Flaviviridae* incluye dengue, fiebre amarilla y dos virus en el grupo de encefalitis transmitida por garrapatas que causan FHV: el virus de la fiebre hemorrágica de Omsk y el virus de la enfermedad del Bosque de Kyasanur.

- 15 También se ha informado del aislamiento de un miembro de *Rbdoviridae* responsable de 2 casos mortales y 2 casos no mortales de fiebre hemorrágica en el distrito de Bas-Congo de la República Democrática del Congo. Los casos no mortales se dieron en trabajadores sanitarios involucrados en el tratamiento de los otros dos, lo que sugiere la posibilidad de transmisión de persona a persona.

- 20 Por consiguiente, por ejemplo, en una realización de particular interés, la presente invención puede aplicarse a virus de la familia *Filoviridae*, tales como el virus del Ébola y el virus de Marburg. En otra realización de particular interés, la presente invención puede aplicarse a virus en la familia *Flaviviridae*, tal como el virus del dengue.

- 25 Por consiguiente, la presente invención proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para su uso en un procedimiento profiláctico o terapéutico según se describe anteriormente, para (i) prevenir o reducir la velocidad de transmisión de una infección por ébola; (ii) prevenir o proteger contra una infección por ébola; o (iii) tratar una infección por ébola, en un sujeto infectado o sospechoso de estar infectado con el virus del ébola, o un sujeto que haya estado o se prevea que vaya a estar en contacto con otro sujeto que esté infectado o se sospeche que esté infectado con el virus del ébola, o que haya estado o que se prevea que vaya a estar en contacto con material biológico presente o producido por otro sujeto que esté infectado o se sospeche que esté infectado con el virus del ébola.

- 30 Por consiguiente, la presente invención proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para uso en un procedimiento profiláctico o terapéutico como se describe anteriormente, para (i) prevenir o reducir la velocidad de transmisión de una infección de Marburg ; (ii) prevenir o proteger contra una infección de Marburg; o (iii) tratar una infección de Marburg, en la que el sujeto está infectado o se sospecha que está infectado con el virus de Marburg, o ha estado o se espera que esté en contacto con otro sujeto que está infectado o se sospecha que está infectado con el virus de Marburg, o ha estado o se espera que esté en contacto con material biológico presente o producido por otro sujeto que está infectado o se sospecha que está infectado con el virus de Marburg.

- 35 Por consiguiente, la presente invención proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para uso en un método profiláctico o terapéutico tal como se describe anteriormente para (i) prevenir o reducir la velocidad de transmisión de una infección por el virus de la fiebre del dengue; (ii) prevenir o proteger contra una infección por el virus de la fiebre del dengue; o (iii) tratar una infección por el virus de la fiebre del dengue, en la que el sujeto está infectado o se sospecha que está infectado con el virus de la fiebre del dengue, o ha estado o se espera que esté en contacto con otro sujeto que está infectado o se sospecha que está infectado con la fiebre del dengue o ha estado o se espera que esté en contacto con material biológico presente o producido por otro sujeto que está infectado o se sospecha que está infectado con el virus de la fiebre del dengue.

- 45 La presente invención también proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para su uso en un procedimiento descrito anteriormente, para tratar, retrasar el inicio y/o retrasar la progresión de la infección del sujeto por el FHV o FHB.

- 50 La presente invención también proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para su uso en un procedimiento descrito anteriormente para prevenir, reducir, retrasar el inicio o retrasar la progresión de los daños directos y/o indirectos por virus o bacterias al sistema inmune y/o vascular del sujeto, tales como los causados por el FHB o FHV.

- 55 Por ejemplo, la presente invención se puede usar para prevenir, reducir, retrasar la aparición, o retrasar la progresión de los daños directos y/o indirectos por virus o bacterias al sistema inmune del sujeto, por ejemplo, en el contexto de una infección por ébola. Por ejemplo, los daños por bacterias o virus se pueden seleccionar entre los daños a la respuesta inmune innata, los daño a la respuesta humoral adquirida, los daño a las células dendríticas,

los daños a la regulación de la producción de factores inflamatorios, tal como la producción de interferón (incluyendo la producción de IL1), los daños a los macrófagos y/o a los monocitos.

La presente invención se puede usar para prevenir, reducir, retrasar la aparición o retrasar la progresión de fugas de sangre (hemorragia), hipotensión, caída de la presión arterial, shock o muerte del sujeto.

- 5 La presente invención se puede usar para prevenir, reducir, retrasar el inicio o retrasar la progresión de los daños por óxido nítrico inducido por virus en el endotelio vascular del sujeto.

10 La presente invención proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para su uso en un procedimiento de prevención, reducción, retraso del inicio o retraso de la progresión del daño, la activación, la muerte y/o la interrupción de la integridad del endotelio vascular o de las células endoteliales del mismo, en un sujeto infectado o sospechoso de estar infectado con un patógeno capaz de causar fiebre hemorrágica, como un VHF o FHB. La integridad del endotelio vascular o de las células endoteliales del mismo puede, por ejemplo, estar determinada por el grado de fuga epitelial celular o vascular y/o por la detección de uno o más eventos hemorrágicos, o la formación de edema y/o deshidratación del sujeto.

15 La presente invención proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para su uso en un procedimiento de prevención, reducción, retraso del inicio o retraso de la progresión del daño, la activación, la muerte y/o la interrupción de la integridad del endotelio vascular o de las células endoteliales del mismo, en un sujeto que ha estado o se prevé que vaya a estar en contacto con otro sujeto que está infectado o se sospecha que está infectado con un patógeno capaz de causar fiebre hemorrágica, tal como un FHV o FHB.

20 La presente invención proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para su uso en un procedimiento de prevención, reducción, retraso del inicio o retraso de la progresión del daño, la activación, la muerte y/o la interrupción de la integridad del endotelio vascular o de las células endoteliales del mismo, en un sujeto que ha estado o se prevé que vaya a estar en contacto con material biológico presente o producido por otro sujeto que está infectado o se sospecha que está infectado con un patógeno capaz de causar fiebre hemorrágica, tal como un FHV o FHB.

25 Una realización adicional de la presente invención proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para su uso según se describe anteriormente con referencia a las diversas realizaciones de la presente invención en un procedimiento profiláctico o terapéutico, en el que la infección viral es causada por un virus que presenta fosfatidilserina (PS) y media infección celular y/o internalización a través de la unión de la PS. De manera alternativa, la infección viral puede ser causada por un virus que presenta uno o más tipos de fosfolípidos que están unidos por la anexina A5 y/u otros restos que están unidos por la anexina A5.

30 Los virus que presentan fosfatidilserina (PS) y median la infección celular y/o la internalización a través de la unión de PS pueden incluir, en particular, virus envueltos que comprenden fosfatidilserina (PS) en su envoltura, especialmente en la capa exterior. La presentación de PS por un virus puede determinarse mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando un estudio ELISA para medir la unión de la anexina A5 al virus. Un procedimiento adecuado puede incluir, por ejemplo, la medición ELISA de la unión de anexina A5 marcada con hemaglutinina (HA) a los antisueros anti-HA, como se describe en Moller-Tank, y col., 2013, J. Virol., 87 (15), 8327-8341.

35 Un grupo de virus de particular interés para la presente invención incluye aquellos que median la infección celular y/o la internalización a través de la unión con un receptor potenciador de la entrada de virus mediado por fosfatidilserina (PVEER, por sus siglas en inglés). Los PVEER se analizan en Moller Tank, y col., 2013, J. Virol., 87 (15), 8327-8341, y uno de sus ejemplos el receptor de la inmunoglobulina de linfocitos T y el receptor de mucina 1 (TIM-1). Otros ejemplos pueden incluir TIM-4, Gas6 o Proteína S/Axl, Mer y Tyro3 y MFG-E8/integrina  $\alpha\beta 3$  o  $\alpha\beta 5$ .

El ébola es un ejemplo de un virus de particular interés que presenta fosfatidilserina (PS) y media la infección celular y/o la internalización a través de la unión de la PS con TIM-1. Moller Tank, y col., 2013, J. Virol., 87 (15), 8327-8341.

45 La presente invención tiene en cuenta que la anexina A5 y la composición del segundo aspecto de la presente invención pueden usarse para inhibir o interrumpir la infección celular mediada por PS y/o la internalización de virus, tales como el virus del ébola, a través de PVEER, tal como TIM-1, y por lo tanto puede ser útil en un procedimiento profiláctico o terapéutico para (i) prevenir o reducir la velocidad de la transmisión de una infección viral; (ii) prevenir o proteger contra una infección viral; o (iii) tratar una infección viral en un sujeto en el que la infección viral está causada por un virus que presenta fosfatidilserina (PS) y media la infección celular y/o la internalización a través de la unión de la PS.

55 Los virus que presentan fosfatidilserina (PS) pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en un virus de la familia *Filoviridae* (como el Ébola y el Marburgo); la familia *Flaviviridae*; hepatitis A; virus alfa; baculovirus; y arenavirus. Los virus pueden ser infecciosos para, o solo para, los seres humanos. Los virus pueden ser infecciosos para, o solo para, animales no humanos, tales como uno o más de los animales seleccionados del grupo que consiste en perros, gatos, vacas, ovejas, cerdos, cabras, roedores, camellos, animales domesticados, y animales salvajes.



Los PVEER, tales como TIM-1, pueden participar en la internalización de virus en diversos tipos de células. En una realización, los tipos de células de particular interés para la protección y/o el tratamiento de acuerdo con la presente invención pueden incluir uno o más tipos de células seleccionadas del grupo que consiste en células epiteliales (incluidas las células epiteliales vasculares), mastocitos, linfocitos B y linfocitos T tales como células CD4+ o células CD8+ y, en particular, células CD4+ activadas.

TIM-1, también conocido como HAVCR1 y KIM-1, se ha identificado como un gen de susceptibilidad para el asma humano (McIntire y col., 2003, Nature 425: 576). Una secuencia de aminoácidos publicada para la proteína TIM-1 humana se muestra como:

MHPQVVILSLILHLADSVAGSVKVGGEAGPSVTLPCHYSGAVTSMCWRGSC  
 SLFTCQNGIIVWTNGTHVTYRKDTRYKLLGDLRDRVSLTIENTAVSDSGVYC  
 CRVEHRGWFNMDMKITVSLIIVPPKVTTPPIVTTVPTVTTVVRTSTTVPTTTTTPM  
 TTVPTTTVPTTMSIPTTTTTLTMTVSTTTSVPTTTSIPTTTSVPVTTTVSTFVPP  
 MPLPRQNHEPVATSPSSPQPAETHPTTLQGAIRREPTSSPLYSYTTDGNDTVTE  
 SSDGLWNNQTQLFLEHSLLTANTTKGIYAGVCISVLVLLALLGVI IAKKYFF  
 KKEVQQLSVSFSLSLQIKALQNAVEKEVQAEDNIYIENSLYATD (SEQ ID NO: 2).

10 TIM-1 es una proteína de membrana tipo I con una región extracelular que contiene un dominio IgV, un dominio rico en mucina y un tallo corto proximal a la membrana que contiene sitios de glicosilación unidos a N (Ichimura y col., 1998, J. Biol. Chem. 273(7):4135-42). El dominio IgV de TIM-1 tiene una conformación dependiente de disulfuro en la que el bucle CC' se pliega sobre las cadenas β de GFC, lo que resulta en una hendidura distintiva formada por los bucles CC' y FG (Santiago y col., 2007, Immunity 26(3):299-310). La hendidura construida por los bucles CC' y FG es un sitio de unión para la fosfatidilserina (Kobayashi y col., 2007, Immunity 27(6):927-40). Los anticuerpos dirigidos a la hendidura CC'/FG del dominio IgV de TIM-1 inhiben la unión de TIM-1 a la fosfatidilserina y las células dendríticas y exhiben actividad terapéutica *in vivo* en un modelo de ratón humanizado de asma alérgica (Sonar y col., 2010, J. Clin. Invest. 120: 2767-81).

20 Una realización adicional de la presente invención se basa en el uso de la composición del segundo aspecto de la presente invención para prevenir, inhibir o reducir la capacidad del dominio IgV de TIM-1, y de otros PVEER, de unirse a la PS presentada a ella. La proteína AnxA5 en la composición del segundo aspecto de la presente invención también tiene preferentemente la capacidad de unirse a la PS y, de acuerdo con esta realización de la presente invención, es capaz de competir con el PVEER para unirse a la PS.

25 Por consiguiente, en una realización adicional, la composición del segundo aspecto de la presente invención se puede usar en un procedimiento que inhibe la unión de fosfatidilserina a TIM-1 (u otro PVEER).

Por ejemplo, esto puede ser útil profilácticamente o terapéuticamente en el contexto de inhibir, reducir o prevenir la infección de células con virus que presentan fosfatidilserina (PS) y median la infección celular y/o la internalización a través de PS.

30 De manera alternativa, esto puede ser útil profilácticamente o terapéuticamente en el contexto de abordar otras afecciones médicas que implican la unión de PS a TIM-1 (u otros PVEER). Los trastornos asociados con TIM-1 se discuten más adelante.

35 Por lo tanto, en otra realización, la presente solicitud describe un procedimiento para inhibir o reducir la unión de TIM-1 u otro PVEER a fosfatidilserina, procedimiento que comprende poner en contacto una primera celda que expresa TIM-1 u otro PVEER con una cantidad de la composición del segundo aspecto de la presente invención que es eficaz para inhibir o reducir la unión de la primera célula a una segunda célula que contiene fosfatidilserina en su superficie celular o a un virus que presenta fosfatidilserina (PS) en su superficie. El procedimiento puede ser un procedimiento *in vivo* o *in vitro*. En el caso de un procedimiento *in vivo*, se puede tratar o prevenir una afección que implique la unión de PS a TIM-1 u otro PVEER.

40 En otras palabras, esta realización de la presente invención también proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para su uso en un procedimiento profiláctico o terapéutico para inhibir o reducir la unión de TIM-1 u otro PVEER, a la fosfatidilserina, en un paciente que lo necesite.

45 En otra realización, la presente solicitud describe un procedimiento para inhibir o reducir la unión de PS a un TIM-1 u otro PVEER en una célula dendrítica, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una célula dendrítica que expresa TIM-1 u otro PVEER con una cantidad de la composición del segundo aspecto de la presente invención eficaz para inhibir o reducir la unión de PS a la célula dendrítica. El procedimiento puede ser un procedimiento *in*

*vivo* o *in vitro*. En el caso de un procedimiento *in vivo*, se puede tratar o prevenir una afección que implique la unión de PS a TIM-1 u otro PVEER en una célula dendrítica.

5 En otras palabras, esta realización de la presente invención también proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para su uso en un procedimiento profiláctico o terapéutico para inhibir o reducir la unión de PS a TIM-1 u otro PVEER en una célula dendrítica, en un paciente que la necesite.

También se desvela un procedimiento para tratar o prevenir una afección inflamatoria o autoinmune, comprendiendo el procedimiento administrar a un mamífero que tiene una afección inflamatoria o autoinmune una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición del segundo aspecto de la presente invención.

10 En otras palabras, esta realización de la presente invención también proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para su uso en un procedimiento profiláctico o terapéutico para prevenir, tratar o reducir la afección inflamatoria o autoinmune.

15 También se desvela un procedimiento para tratar o prevenir el asma, procedimiento que comprende administrar a un mamífero que tiene asma una composición farmacéutica que comprende la composición del segundo aspecto de la presente invención.

En otras palabras, esta realización de la presente invención también proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para uso en un procedimiento profiláctico o terapéutico para prevenir, tratar o reducir el asma.

20 También se desvela un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno atópico, procedimiento que comprende administrar a un mamífero que tiene un trastorno atópico una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición del segundo aspecto de la presente invención. El trastorno atópico puede ser, por ejemplo, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticaria, rinitis alérgica, angioedema, alergia al látex o un trastorno pulmonar alérgico (por ejemplo, asma, aspergilosis broncopulmonar alérgica o neumonitis por hipersensibilidad).

25 En otras palabras, esta realización de la presente invención también proporciona la composición del segundo aspecto de la presente invención para uso en un procedimiento profiláctico o terapéutico para prevenir, tratar o reducir un trastorno atópico.

30 La composición del segundo aspecto de la presente invención se puede usar según se describe en el presente documento para tratar o prevenir una variedad de trastornos asociados con TIM-1, y otros trastornos asociados con PVEER, incluyendo trastornos inmunológicos, tales como trastornos inflamatorios y autoinmunes.

El término "tratar" incluye el significado de administrar una sustancia o composición descrita en el presente documento en una cantidad, manera y/o modo eficaz para mejorar una afección, síntoma o parámetro asociado con un trastorno o para prevenir la progresión o exacerbación del trastorno (incluyendo los daños secundarios causados por el trastorno) en un grado estadísticamente significativo o en un grado detectable para un experto en la materia.

35 Un sujeto que corre riesgo de padecer, que ha sido diagnosticado con o que padece uno de estos trastornos puede recibir la composición del segundo aspecto de la presente invención en una cantidad y durante un tiempo para proporcionar un efecto terapéutico global. La composición del segundo aspecto de la presente invención se puede administrar sola (monoterapia) o en combinación con otros agentes (terapia de combinación), ya sea en mezcla o por administración separada, simultánea o secuencial. En el caso de una terapia de combinación, las cantidades y los tiempos de administración pueden ser aquellos que proporcionan, por ejemplo, un efecto terapéutico aditivo o sinérgico. Además, la administración de la composición del segundo aspecto de la presente invención (con o sin el segundo agente) se puede utilizar como un tratamiento primario, por ejemplo, de primera línea, o como un tratamiento secundario, por ejemplo, para sujetos que hayan tenido una respuesta inadecuada a una terapia previamente administrada (es decir, una terapia diferente a una con una proteína AnxA5).

45 Las enfermedades o afecciones tratables con la composición del segundo aspecto de la presente invención descrita en el presente documento incluyen, por ejemplo, lesión por isquemia-reperusión (por ejemplo, lesión por isquemia-reperusión de órganos, como lesión por isquemia-reperusión hepática o renal), alergia, asma, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn, rechazo del trasplante, pancreatitis e hipersensibilidad de tipo tardía (DTH).

50 Las enfermedades o afecciones adicionales tratables con la composición del segundo aspecto de la presente invención descritas en el presente documento incluyen, por ejemplo, trastornos autoinmunes.

El lupus eritromatoso sistémico (LES; lupus) es un trastorno autoinmune mediado por TH-2 caracterizado por altos niveles de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos intracelulares tales como ADN bicatenario, ADN monocatenario e histonas.

Ejemplos de otras enfermedades autoinmunes sistémicas o específicas de órganos adecuadas para el tratamiento con la composición del segundo aspecto de la presente invención descritas en el presente documento incluyen miastenia grave, anemia hemolítica autoinmune, enfermedad de Chagas, enfermedad de Graves, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), granulomatosis de Wegener, poliarteritis nodosa y glomerulonefritis creciente rápidamente progresiva. Véase, por ejemplo, Benjamini y col., 1996, *Immunology, A Short Course, Third Ed.* (Wiley-Liss, Nueva York). Además, la artritis reumatoide (AR) es adecuada para el tratamiento con anexina A5 tal como se describe en el presente documento.

Enfermedades o afecciones adicionales asociadas con TIM-1 tratables con la composición del segundo aspecto de la presente invención descrita en el presente documento incluyen, por ejemplo, la enfermedad de injerto contra huésped (EICH). La EICH es un ejemplo de una afección mediada por linfocitos T que se puede tratar con anexina A5 que se describe en el presente documento. La EICH se inicia cuando los linfocitos T del donante reconocen los antígenos del huésped como extraños. La EICH, a menudo una consecuencia fatal del trasplante de médula ósea (TMO) en pacientes humanos, puede ser aguda o crónica. Las formas agudas y crónicas de EICH ejemplifican el desarrollo de respuestas específicas de antígeno Th1 y Th2, respectivamente. La EICH aguda ocurre dentro de los primeros dos meses después del TMO, y se caracteriza por daños mediados por linfocitos T citotóxicos del donante en la piel, el intestino, el hígado y otros órganos. La EICH crónica aparece más tarde (más de 100 días después del TMO) y se caracteriza por la hiperproducción de inmunoglobulina (Ig), incluyendo autoanticuerpos y daños en la piel, los riñones y otros órganos causados por la deposición de Ig. Casi el 90 % de los pacientes con EICH aguda desarrollan EICH crónica. La EICH crónica parece ser una enfermedad mediada por linfocitos T Th2 (De Wit y col., 1993, *J. Immunol.* 150: 361-366). La EICH aguda es una enfermedad mediada por Th1 (Krenger y col., 1996, *Immunol. Res.* 15: 50-73; Williamson y col., 1996, *J. Immunol.* 157: 689-699). La citotoxicidad de los linfocitos T es una característica de la EICH aguda. La consecuencia de la citotoxicidad antihuésped del donante se puede ver de varias maneras. En primer lugar, los linfocitos del huésped se destruyen rápidamente, de modo que los ratones que experimentan EICH aguda están profundamente inmunodeprimidos. En segundo lugar, los linfocitos del donante se injertan y se expanden en el bazo del huésped, y su actividad citotóxica puede medirse directamente *in vitro* aprovechando las líneas celulares que expresan los antígenos del huésped que pueden ser reconocidos (como extraños) por los linfocitos del donante. En tercer lugar, la enfermedad se vuelve letal a medida que se destruyen más tejidos y poblaciones celulares.

Enfermedades o afecciones adicionales asociadas con TIM-1 tratables con la composición del segundo aspecto de la presente invención descrita en el presente documento incluyen, por ejemplo, trastornos atópicos. Los trastornos atópicos se caracterizan por la expresión de las células del sistema inmunológico, incluidas las células T activadas y APC, de citoquinas, quimiocinas y otras moléculas que son características de las respuestas Th2, como las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13, entre otras. Tales trastornos atópicos, por lo tanto, serán susceptibles de tratamiento con la composición del segundo aspecto de la presente invención tal como se describe en el presente documento. Los trastornos atópicos incluyen hipersensibilidad de las vías respiratorias y síndromes de distrés, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticaria, rinitis alérgica, angioedema, alergia al látex y un trastorno alérgico pulmonar (por ejemplo, asma, aspergilosis broncopulmonar alérgica y neumonitis por hipersensibilidad).

Enfermedades o afecciones adicionales asociadas con TIM-1 tratables con la composición del segundo aspecto de la presente invención según se describe en el presente documento incluyen, por ejemplo, numerosos trastornos inmunes o inflamatorios. Los trastornos inmunes o inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, rinitis alérgica, anemia hemolítica autoinmune; acantosis nigricans; enfermedad de Addison; alopecia areata; alopecia universalis; amiloidosis; púrpura anafilactoide; reacción anafilactoide; anemia aplásica; espondilitis anquilosante; arteritis craneal; arteritis de células gigantes; arteritis de Takayasu; arteritis temporal; ataxia-telangiectasia; ooforitis autoinmune; orquitis autoinmune; fallo poliendocrino autoinmune; enfermedad de Behcet; enfermedad de Berger; enfermedad de Buerger; bronquitis; pénfigo bulloso; candidiasis mucocutánea crónica; síndrome de Caplan; síndrome de infarto postmiocárdico; síndrome postpericardiotomía; carditis; celiacía; enfermedad de Chagas; síndrome de Chediak-Higashi; enfermedad de Churg-Strauss; síndrome de Cogan; enfermedad por aglutininas frías; síndrome de CREST; enfermedad de Crohn; crioglobulinemia; alveolitis fibrosante criptogénica; dermatitis herpetiformis; dermatomiositis; diabetes mellitus; síndrome de Diamond-Blackfan; síndrome de DiGeorge; lupus eritematoso discoide; fascitis eosinofílica; episcleritis; eritema elevatum diutinum; eritema marginado; eritema multiforme; eritema nodoso; fiebre mediterránea familiar; síndrome de Felty; fibrosis pulmonar; glomerulonefritis anafilactoide; glomerulonefritis autoinmune; glomerulonefritis postestreptocócica; glomerulonefritis postrasplante; glomerulopatía membranosa; síndrome de Goodpasture; granulocitopenia inmunomediada; granuloma anular; granulomatosis alérgica; miositis granulomatosa; enfermedad de Graves; tiroiditis de Hashimoto; enfermedad hemolítica del recién nacido; hemocromatosis idiopática; púrpura de Henoch-Schoenlein; hepatitis crónica activa y hepatitis crónica progresiva; histiocitosis X; síndrome hipereosinofílico; púrpura trombocitopénica idiopática; síndrome de Job; dermatomiositis juvenil; artritis reumatoide juvenil (artritis crónica juvenil); enfermedad de Kawasaki; queratitis; queratoconjuntivitis sicca; síndrome de Landry-Guillain-Barre-Strohl; lepra lepromatosa; síndrome de Loeffler; lupus; síndrome de Lyell; enfermedad de Lyme; granulomatosis linfomatoide; mastocitosis sistémica; enfermedad mixta del tejido conectivo; mononeuritis múltiple; síndrome de Muckle-Wells; síndrome de ganglio linfático mucocutáneo; síndrome de ganglio linfático mucocutáneo; reticulohistiocitosis multicéntrica; esclerosis múltiple; miastenia gravis; micosis fungoide; vasculitis necrotizante sistémica; síndrome nefrótico; síndrome de superposición; paniculitis; hemoglobinuria paroxística fría; hemoglobinuria paroxística nocturna;

- penfigoide; pénfigo; pénfigo eritematoso; pénfigo foliáceo; pénfigo vulgar; enfermedad del criador de palomas; poliarteritis nodosa; polimialgia reumática; polimiositis; polineuritis idiopática; polineuropatías familiares portuguesas; preeclampsia/eclampsia; cirrosis biliar primaria; esclerosis sistémica progresiva (esclerodermia); psoriasis; artritis psoriásica; proteinosis alveolar pulmonar; fibrosis pulmonar, fenómeno/síndrome de Raynaud; tiroiditis de Reidel;
- 5 síndrome de Reiter, policrondritis recurrente; fiebre reumática; artritis reumatoide; sarcoidosis; escleritis; colangitis esclerosante; enfermedad sérica; síndrome de Sezary; síndrome de Sjogren; síndrome de Stevens-Johnson; enfermedad de Still; panencefalitis esclerosante subaguda; oftalmia simpática; lupus eritematoso sistémico; rechazo de transplantes; colitis ulcerosa; enfermedad indiferenciada del tejido conectivo; urticaria crónica; urticaria fría; uveítis; vitiligo; enfermedad de Weber-Christian; granulomatosis de Wegener o síndrome de Wiskott-Aldrich.
- 10 La presente invención se describirá ahora con referencia a uno o más ejemplos no limitantes.

### **EJEMPLOS**

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones particulares de la invención.

#### **Ejemplo comparativo 1**

- 15 El procedimiento de Marder y col., 2014, BMC Biotechnology, 14:33 informa sobre el procesamiento de cultivos de 1 L y consiste en dos centrifugaciones de 38.900 g de 30 minutos de duración, que en la primera etapa de centrifugación precipitan la anexina A5 unida a los residuos celulares, y en la segunda etapa de centrifugación precipitan los residuos celulares manteniendo la anexina A5 en solución.

El siguiente análisis se proporciona para calcular las implicaciones de ampliar el procedimiento de Marder y col., desde 1L hasta un volumen de cultivo comercialmente relevante de 1000L.

- 20 Basándose en una selección de las mejores centrifugas disponibles actualmente con los mejores rotores para un rendimiento máximo, se pueden tomar 6x250 ml = 1,5 litros y pueden alcanzar 30.200-38.400 g. Algunos ejemplos son el costoso rotor de fibra de carbono liviano (rotos de ángulo fijo Fiberlite F14-6 x 250y) para uso en las centrifugas de alta velocidad Thermo Scientific™ Sorvall™ LYNX o el rotor JLA-16.250, de ángulo fijo, aluminio, tapa de bioseguridad, 6 x 250 mL, 38.400 x g para uso en Beckmancoulters Avanti JXN-26. Usando tales centrifugas
- 25 avanzadas de alto nivel, para cargar la centrifuga, arrancar y acelerar a la velocidad requerida, se emplean 30 minutos a fuerza G máxima, luego se deja que se detenga cuidadosamente para no perturbar el sedimento, y luego se emplean aproximadamente 45 minutos para vaciar el rotor.

Es decir, las mejores centrifugas disponibles actualmente permiten el procesamiento de 1,5 litros en 45 min.

- 30 Marder y col. informan (en la sección titulada "Purification") que 3 g de peso húmedo de las células se suspendieron en 30 mL de tampón antes de la sonicación y la centrifugación. Por consiguiente, la concentración de peso celular húmedo (WCW) utilizada por Marderet y col., durante las centrifugaciones fue (3 gramos en 30 ml de tampón) = 9,1 % de WCW.

- Marder y col. (en la sección "Bioreactor cultivation" en la segunda página) también informa un valor promedio de 27,48 g (DCW) L<sup>-1</sup> (SD = 1,96) para la concentración de biomasa. Por lo tanto, la concentración de peso celular seco (DCW) en el fermentador de Marder fue de 27,48 gr/L = 2,748 %. Se sabe que 1 gramo de DCW = aproximadamente 4 gramos de peso celular húmedo (WCW). Por lo tanto, en el fermentador de concentración celular había una concentración de WCW de 2,748 x 4 = 11,0 %. Si se escala esto hasta un volumen de cultivo de 1000 L y se hace una suposición conservadora de una pérdida celular del 5 % durante la cosecha de 1000 L, entonces la WCW en un tanque de 1000 L utilizando el procedimiento de Marder = 1000 x 11 % x 0,95 = 104,5 kg de
- 40 WCW.

El procedimiento de centrifugación de Marder utilizó una concentración de WCW del 9,1 % durante la etapa de centrifugación. Por lo tanto, 104,5 kg de WCW de un cultivo de 1000 L tendrían que diluirse a una concentración de WCW de 9,1 %, lo que requiere un volumen total para ser centrifugado de 1148 L.

- 45 Suponiendo generosamente que una instalación de biofabricación tiene dos centrifugadoras avanzadas de alta gama, de modo que una puede usarse para la granulación de la anexina con residuos celulares (primera centrifugación), mientras que la otra puede funcionar en paralelo con la segunda centrifugación cuando la anexina está en solución y los residuos celulares se acumulan entonces:

El tiempo total para centrifugar la solución de 1148 L es, pudiendo las centrifugadoras procesar 1,5 litros por 45 min = 1148/1,5 = 766 centrifugaciones a 45 min cada una = 34.470 min = 574,5 horas.

- 50 Suponiendo que la instalación de biofabricación funcionara 12 horas por día, entonces el procesamiento de la WCW de un tanque de 1000 L utilizando el procedimiento de Marder y col. llevaría 48 días de trabajo o (asumiendo cinco días hábiles por semana) 10 semanas solo para las centrifugaciones.

En total, se necesitarían aproximadamente dos semanas adicionales para la fermentación, el procesamiento posterior y otras operaciones. Esto da 12 semanas en la planta de fabricación para preparar y procesar las células

de un cultivo de 1000 L, asumiendo que la planta de biofabricación está completamente ocupada con ese procedimiento, por lo que ninguna otra producción puede ocurrir en la misma planta mientras tanto. Esto es a pesar de la generosa suposición de que hay dos centrifugas disponibles. Si solo se utiliza una centrifuga, el tiempo de fabricación sería de 22 semanas para un lote de 1000 L.

- 5 Por el contrario, según se explica a continuación, los procedimientos de la presente invención pueden procesar un cultivo de 1000 L en solo dos semanas, es decir, aproximadamente 6 veces más rápido (y también proporcionan un producto de calidad mucho más alta, con un rendimiento mucho mayor que el producto del procedimiento de Marder y col.).

- 10 El coste de fabricación es directamente proporcional al tiempo de fabricación, ya que la planta de fabricación estará ocupada y ninguna otra producción podrá tener lugar en la misma planta mientras tanto.

El rendimiento de la anexina A5 en el procedimiento de la presente invención se calcula que es 2-3 veces mayor por lote que el producto producido por Marder y col. Esto hace que el coste de fabricación por gramo de proteína anexina A5 entre ( $6 \times 2-3 =$ ) sea 12-18 veces más alto para el procedimiento de Marder.

- 15 Además, la pureza de la proteína del procedimiento de Marder no sería adecuada para uso humano. A pesar de las centrifugaciones elaboradas, solo se utiliza una etapa de cromatografía de intercambio aniónico que está muy por debajo de los requisitos para alcanzar la pureza suficiente con respecto a las impurezas relacionadas con el procedimiento (especialmente las endotoxinas) y las variantes relacionadas con el producto. Marder no muestra ningún dato sobre los niveles de endotoxinas u otras impurezas que indiquen, además, falta de idoneidad para el uso farmacéutico.

- 20 Además, las operaciones de centrifugación muy lentas del procedimiento de Marder requieren que la proteína anexina A5 esté en un entorno inestable durante un largo período de tiempo. Es probable que esto resulte en la degradación o modificación del producto y supone un inconveniente adicional del largo tiempo de operación de fabricación, con implicaciones negativas para la calidad del producto.

### **Ejemplo 1**

- 25 **Abreviaturas:**

AP	Aqua Purificata (agua purificada)	FN	formulario nacional
BV	Bovenau	NL	Litro normal
cIEF	Enfoque isoeléctrico capilar	NMWC0	Corte de peso molecular nominal
CX	Cromatografía de intercambio catiónico	n.p.	no realizado
CFU	unidad formadora de colonias	n.s.	no especificado
CR	sala de columnas	OD	Densidad óptica
CRG	Grado de la sala de columnas	PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
VC	Volumen de la columna	PBS	tampón fosfato salino
DF	Diafiltración	PC	policarbonato
DP	Producto farmacéutico	PETG	Copoliéster de tereftalato de polietileno modificado con glicol
DSP	Procedimiento descendente	PES	Polietersulfona
DS	Sustancia farmacéutica	Ph.Eur.	Farmacopea europea
EU	Unidades de endotoxinas	PP	polipropileno
EVA	copolímero de etileno vinil acetato	PPG	polipropilenglicol
EVOH	copolímero de etileno vinil etanol	PVDF	Fluoruro de polivinilideno
FF	prueba de flujo hacia adelante / prueba de difusión	QA	Departamento de Garantía de Calidad
FIO	Solo a título informativo	QC	Departamento de Control de Calidad
g	gramo	RHB	Richter-Helm BioLogics
h	horas	RPC	Cromatografía de fase inversa
H	Hanover	rpm	rotación por minuto
PCH	Proteína de la célula huésped	RT	Temperatura ambiente (20 - 25 °C)
HH	Hamburgo	SDS	dodecil sulfato de sodio
ID	Diámetro interno	SEC	cromatografía de exclusión por tamaño
IEX	Cromatografía de intercambio iónico	TFF	Filtración de flujo tangencial
IPC	Control durante el procedimiento	TMP	Presión transmembrana
L	Litro	UF	Ultrafiltración

(continuación)

LAF	Flujo de aire laminar	USP	Procedimiento ascendente
LDPE	Polietileno de baja densidad	USP	Farmacopea de los Estados Unidos
MCB	Banco de células maestras	v/v	Volumen por volumen
min	minutos	WB	western blot
MRS	norma maestra de referencia	WCB	Banco de células de trabajo
n. a.	no aplicable	WFI	Agua para inyección

**Introducción:**

5 Los 320 aminoácidos que contienen proteína -36 kDa recombinante anexina A5 se expresan en el citoplasma de la *E. coli* BL21/pHIP.ANXA5. La anexina A5 recombinante se produce principalmente en su forma soluble. Se utiliza un plásmido de expresión inducible por calor pHIP, que lleva la secuencia codificante de la anexina A5. El marcador selectivo es un gen de resistencia a la kanamicina. Se ha establecido y caracterizado ampliamente un MCB del clon respectivo.

10 El procedimiento de fabricación se amplía de una escala de laboratorio equivalente a 3 L de volumen de fermentación a una gran escala equivalente a 100 L de volumen de fermentación.

15 El procedimiento desarrollado incluye una eficiente captura de intercambio aniónico a partir de lisado bruto seguido de una etapa de afinidad con heparina inmovilizada en presencia de calcio. Esta etapa de afinidad intermedia es altamente específica para la anexina A5. Como etapa final de pulido se utiliza una cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución. La etapa de pulido permite una separación de impurezas relacionadas con el producto. La formulación se realiza mediante ultrafiltración utilizando un casete NMWCO de 10 kDa.

20 Este ejemplo describe y evalúa las adaptaciones/cambios planeados en el procedimiento de fabricación, determina los parámetros operativos y las medidas necesarias para asegurar una transferencia exitosa y define los criterios de aceptación para determinar su éxito. Se muestra una transferencia exitosa por el desempeño de un procedimiento posterior que implementa las adaptaciones al procedimiento de escala de laboratorio con respecto al aumento de escala que da como resultado un DS de rendimiento y calidad comparables.

El objetivo general del proyecto es el desarrollo de un procedimiento de fabricación de cGMP para anexina A5.

**Comparación y evaluación de procedimientos**

En esta sección, se evalúan los parámetros del procedimiento, las materias primas, los consumibles, los tampones y los equipos utilizados.

25 La Figura 2 muestra una vista general esquemática del procedimiento completo para la fabricación de anexina A5.

La Tabla 1 compara y evalúa las materias primas utilizadas en los procedimientos de 3L y 100L.

**Tabla 1: Comparación de las materias primas utilizadas por los procedimientos de 3L y 100 L**

Materia prima	Procedimiento 3 L		Procedimiento 100 L	
	Proveedor	Calidad	Proveedor	Calidad
Tris (hidroximetil) aminometano (Tris)	Merck	Ph.Eur.	Merck	Ph.Eur.
Cloruro de magnesio heptahidratado	Merck	Ph.Eur.	Merck	Ph.Eur.
Cloruro de sodio	Merck	Ph.Eur.	Merck	Ph.Eur.
Tween-80 (polisorbato)	Merck	Ph.Eur.	Merck	Ph.Eur.
Hidróxido de sodio	Merck	Ph.Eur.	Merck	Ph.Eur.
Nucleasa Benzonasa	Merck/ Novagen	Pureza > 90 %	Merck	Pureza > 90 %
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck	Ph.Eur.	Merck	Ph.Eur.
Titriplex III	Merck	Ph.Eur.	Merck	Ph.Eur.
Bis-Tris 1,3-bis [tris (hidroximetil)-metilamino] propano	Merck	Grado ultrol	Sigma	BioUltra
Agua	RHB HH	Bidest/Ampuv a (Fresenius)	Fresenius Biochrom	Ph.Eur.
Etanol	Merck	Emprove	Merck	EMSURE® ACS,ISO
	<b>Procedimiento 3 L</b>		<b>Procedimiento 100 L</b>	

(continuación)

Materia prima	Proveedor	Calidad	Proveedor	Calidad
Ácido clorhídrico	Merck	Emprove exp.Ph.Helv	Merck	p.A.
Ácido ortofosfórico	Merck	Emprove exp.Ph.Helv	Merck	Ph.Eur.
Hidróxido de sodio 33 %	Reher&Ramsden	n.a.	---	---

5 La Tabla 2 compara y evalúa los consumibles utilizados por los procedimientos 3L y 100L. Los consumibles (dispositivos de muestreo y tubos) no deberían tener un impacto en la calidad del producto y el rendimiento del procedimiento DSP. Todos los materiales utilizados cumplen con las especificaciones requeridas.

**Tabla 2: Lista de consumibles**

Consumible	Procedimiento 3 L		Procedimiento 100 L	
	Proveedor	Calidad	Proveedor	Calidad
Filtro Profundidad Cuno SP 60	3M, CUNO	USP clase VI	3M, CUNO	USP clase VI
Q Sepharose XL (Resina AX)	GE Healthcare	Monografía de fabricantes	GE Healthcare	Monografía de fabricantes
Heparina HyperD M (Resina AF)	Pall	Monografía de fabricantes	Pall	Monografía de fabricantes

(continuación)

Source15 Q (Resina AX)	GE Healthcare	Monografía de fabricantes	GE Healthcare	Monografía de fabricantes
0,2 µm Filtro Sartopore 2 0,45-0,2 µm	Sartorius	USP clase VI	Sartorius	USP clase VI
0,2 µm Filtro EKV, Supor	Pall	USP clase VI	Pall	USP clase VI
Casete UF/DF, Hydrosart, Membrana 10 kDa	Sartorius	USP clase VI	Sartorius	USP clase VI

10 Observaciones generales:

- Todos los consumibles utilizados son materiales de un solo uso o dedicados al producto.
  - Las bolsas utilizadas para el almacenamiento intermedio y como contenedor de producto intermedio son de Sartorius con una capa de PE/EVOH (película CX5-14) durante todo el procedimiento. Bolsas validadas por el fabricante con respecto a, por ejemplo, esterilidad, endotoxinas bajas, lixiviables y extraíbles.
- 15
- Todos los demás consumibles utilizados, incluidos los materiales con contacto con el producto, como tubos, conectores, sistemas de muestreo o recipientes de muestras, son aptos para su propósito en la etapa respectiva del procedimiento. Esto incluye generalmente una certificación USP clase VI, esterilidad y/o endotoxinas bajas, si procede. Los tubos de silicona curados con platino se utilizan en todo el DSP, excepto los tubos C-Flex premontados a las bolsas. Todos los consumibles utilizados están exentos de componentes derivados de animales o se dispone de un certificado TSE.
- 20

La Tabla 3 compara el equipo utilizado por los procedimientos de 3L y 100 L para la fabricación de anexina A5.

**Tabla 3: Lista de equipos utilizados**

Equipo	Procedimiento 3 L		Procedimiento 100 L	
	Tipo	Fabricante	Tipo	Fabricante
Termómetro	n.a.	Hanna	> 0-100 °C	Amarell
Pipeta	n.a.	Eppendorf	diferente	Eppendorf
Bomba	n.a.	Watson Marlow	604 U/R	Watson Marlow
Bomba	n.a.	Watson Marlow	505DU	Watson Marlow
Bomba	n.a.	n.a.	1000S	QuattroFlow

(continuación)

Equipo	Procedimiento 3 L		Procedimiento 100 L	
	Tipo	Fabricante	Tipo	Fabricante
LPLC-sistema 1	Åkta 100	GE Healthcare	BioProcess	GE Healthcare
Columna de captura	XK 50	GE Healthcare	BPG300	GE Healthcare
Columna intermedia	XK 50	GE Healthcare	BPG300	GE Healthcare
Columna de pulido	FineLine 70	GE Healthcare	Fineline20 0	GE Healthcare
Sistema de ultrafiltración	n.a.	n.a.	UFDH-H1	PALL
Fotómetro	Ultrospec 3100	GE Healthcare	Ultrospec x300	GE Healthcare
Medidor de pH-/conductividad + Impresora	MPC227	Mettler-Toledo	CG HI 730P	Schott Hanna WTW
Cabina de flujo de aire laminar (LAF)	n.a.	Herasafe	HS	Herasafe
Agitador de imán	n.a.	IKA	RET/REO	IKA
Bomba aspiradora	n.a.	KNF	-	-
Dispositivo de prueba de integridad del filtro	n.a.	n.a.	AquaWIT Exacta	PALL Millipore

5 Medios, tampones y soluciones como se muestra en la **Tabla 4**. Las especificaciones de los tampones se adaptan solo con respecto a la conductividad y se basan en preparaciones de tampones de prueba. Los tampones se preparan antes del proceso, se prueban según sus especificaciones, se microfiltran (filtro de 0,2 µm) y se almacenan (tiempo de retención ≤ 3 meses a temperatura ambiente). El muestreo de los tampones (como referencia; análisis: endotoxina, Bioburden) se realiza en el momento del uso.

**Tabla 4: Lista de medios y soluciones**

Tampón	Procedimiento 3 L		Procedimiento 100 L
	Composición	Aplicación	Composición
tampón de homogeneización 1	50 mM Tris; pH 7,4, 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 % Tween80	Homogeneización	50 mM Tris; pH 7,4, 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 % Tween80
Tampón de acondicionamiento o después de la homogeneización 1	1 % Tween80 (p/v)	Captura	1 % (v/v) Tween 80, 4 mM EDTA, pH 8,0
Tampón de acondicionamiento o después de la homogeneización 2	0,5 M EDTA	Captura	
Tampón A AX	20 mM Tris, 25 mM NaCl, 0,1 % Tween80, pH 7,4	Captura	20 mM Tris, 25 mM NaCl, 0,1 % Tween80, pH 7,4
Tampón B AX	20 mM Tris, 300 mM NaCl, 0,1 % Tween80, pH 7,4	Captura	20 mM Tris, 300 mM NaCl, 0,1 % Tween80, pH 7,4
CIP1 AX	2 M NaCl	Captura	2 M NaCl
CIP 2AX	1 M NaOH	Captura	1 M NaOH
Tampón A AF	20 mM Tris, 25 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,1 % Tween80, pH 7,4	Intermedia	20 mM Tris, 25 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,1 % Tween80, pH 7,4
Lavado con tampón AF	20 mM Tris, 25 mM NaCl, 0,1 % Tween80, pH 7,4	Intermedia	20 mM Tris, 25 mM NaCl, 0,1 % Tween80, pH 7,4
Tampón B AF	20 mM Tris, 10 mM EDTA, 25 mM NaCl, 0,1 % Tween80, pH 7,4	Intermedia	20 mM Tris, 10 mM EDTA, 25 mM NaCl, 0,1 % Tween80, pH 7,4
CIP 1AF	50 mM Tris, 2M NaCl, pH 7,4	Intermedia	50 mM Tris, 2 M NaCl, pH 7,4
CIP 2 AF	0,1 M NaOH	Intermedia	0,1 M NaOH
Almacenamiento AF	25 % EtOH, 1 M NaCl	Intermedia	25 % EtOH, 1 M NaCl
Acondicionamiento 2 AX	35mM Tris, 0.1% Tween80, 12,5mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,0	Pulido	35 mM Tris, 0,1 % Tween80, 12,5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,0



(continuación)

	Procedimiento 3 L		Procedimiento 100 L
Tampón	Composición	Aplicación	Composición
Tampón A AX	20 mM Bis-Tris, 25 mM NaCl, pH 7,4	Pulido	20mM Bis-Tris, 25mM NaCl, pH 7,4
Tampón B AX	20 mM Bis-Tris, 180mM NaCl, pH 7,4	Pulido	20 mM Bis-Tris, 180 mM NaCl, pH 7,4
Tampón UF/DF	20 mM Bis-Tris, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,0	Formulación	20 mM Bis-Tris, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,0
Poste de acondicionamiento UF/DF	10 % Tween80, 20 mM Bis-Tris, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,0	Formulación	10 % Tween80, 20 mM Bis-Tris, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,0

- 5 Se desarrolló un procedimiento de fermentación de alimentación por lotes escalable y se amplió en la unidad de producción. El procedimiento de purificación posterior incluye tres etapas de cromatografía. Tratamiento posterior a la benzonasa, la corriente de alimentación filtrada y diluida se aplica a la cromatografía AX (Q Sepharose XL, GE Healthcare) como primera etapa de captura. El eluato se acondiciona mediante dilución para permitir una purificación intermedia mediante cromatografía de afinidad (Heparin Hyper D M, Pall). La combinación de AF se diluye y se aplica a una etapa final de cromatografía AX (Source15 Q, GE Healthcare). Finalmente, se realiza una concentración y un cambio de tampón por UF/DF.
- 10 Se llevó a cabo una prueba piloto exitosa a DSP equivalente a un volumen de fermentación de 3 L para demostrar el rendimiento adecuado del procedimiento para todas las etapas del mismo.

Los rangos objetivo se definieron mediante el procedimiento a pequeña escala y se utilizan para evaluar el resultado de la ampliación.

**Comparación de procedimientos**

- 15 En las siguientes secciones, el procedimiento descendente a escala de laboratorio (DSP) se describe en detalle en base a una ejecución piloto realizada a escala de procedimiento equivalente a un volumen de fermentación de 3 L. En general, además de la carga a la primera captura, las etapas cromatográficas se realizan a escala de laboratorio con un sistema Aekta Explorer. A gran escala, todas las etapas cromatográficas se realizan con un sistema de Bioprocess. El factor de aumento de escala para el DSP es 33 (de 3 L<sub>USP</sub> a 100 L<sub>USP</sub>).

20 **1.1.1 Resuspensión de biomasa, tratamiento con Benzonasa y disrupción celular**

- 25 En la post fermentación, la biomasa se recolecta por centrifugación y se almacena a -20 °C. El procesamiento posterior comienza con la descongelación de la biomasa y la resuspensión en el tampón de homogeneización 1. Antes de la homogeneización, se añade Benzonasa, prediluida en tampón de homogeneización (3,300 U/L<sub>USP</sub> o 1,850 U/biomasa en suspensión) a las células resuspendidas. El coeficiente de resuspensión se establece en 1 g de biomasa/10 mL. La homogeneización se realiza en tres ciclos con 600 bar para alcanzar un alto grado de homogeneidad, lo que es beneficioso para la siguiente etapa de captura. No se necesita enfriamiento activo dentro de la homogeneización, ya que se desea una temperatura elevada de hasta 40 °C para permitir una digestión óptima de los ácidos nucleicos con Benzonasa. En pequeña escala se obtuvieron temperaturas que oscilaron entre 36 y 40 °C.

- 30 A continuación, se muestra un diagrama de flujo del procedimiento para la resuspensión de la biomasa, el tratamiento con Benzonasa y la rotura celular:

Etapas del procedimiento	Parámetro	Procedimiento 3 L	Procedimiento 100 L
Resuspensión para homogeneización	Tampón:	50 mM Tris; pH 7,4, 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 % Tween80	50 mM Tris; pH 7,4, 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 % Tween80
	Temperatura del tampón: Coeficiente:	RT 1 g/10 mL	RT 1g/8-10 mL
▼ Adición de benzonasa	Benzonasa (stock 25 U/mL):	1,850 U/Lres biomasa	3.300 U/L <sub>USP</sub>

(continuación)

Etapa del procedimiento	Parámetro	Procedimiento 3 L	Procedimiento 100 L
▼	Pre-dilución en tampón de homogeneización:	En 1/10 del volumen de resuspensión final	En 1 L de tampón de resuspensión
Homogeneización a alta presión	Presión:	600 bar	600 bar
▼	Ciclos:	3	3
Almacenamiento del homogeneizado	Condiciones:	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente

5 Después de la homogeneización, el lisado se aclara por filtración utilizando un filtro de profundidad Cuno 60 SP (0,6-0,2  $\mu\text{m}$ ). Esta etapa se realiza para reducir adicionalmente el contenido de ácidos nucleicos y para obtener una solución con partículas reducidas que se puede aplicar para la cromatografía de captura. El filtro de profundidad se lava previamente con agua de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Después de la filtración, el lisado se diluye 2 veces con 1 % de Tween80. Se añade EDTA a una concentración final de 2 mM.

10 Este conjunto acondicionado se aplica fuera de línea, con una bomba peristáltica, a la cromatografía de captura AX. La columna de captura AX se equilibra con dos volúmenes de columna (VC) (20 mM Tris pH 7,4, Tween80 al 0,1 %, 25 mM NaCl) a una velocidad de bombeo lineal de 200 cm/h.

15 Después de la carga, la columna se lava fuera de línea con tampón de equilibrio durante 5 VC y posteriormente se transfiere al sistema de cromatografía para realizar 5 VC adicionales de lavado. La elución de anexina A5 se realiza con una elución escalonada para 9 VC utilizando una concentración de sal más alta (20 mM Tris, pH 7,4; Tween80 al 0,1 %; 300 mM NaCl). El fraccionamiento se define a partir de la elevación de la señal UV<sub>280nm</sub> por 0,1 unidades de absorción (UA) a 0,2 UA en el pico descendente. Todo el pico de elución se procesa adicionalmente.

Se lleva a cabo un procedimiento de CIP de dos etapas para regenerar y limpiar la columna (Etapa 1: 2 M NaCl para 3 VC 100 cm/h; flujo ascendente / Etapa 2: 1 M NaOH, 3 VC; incubación durante >15 h, 40 cm/h de flujo ascendente). La columna finalmente se almacena en 20 mM de NaOH.

20 La Figura 3 proporciona un diagrama de flujo del procedimiento para la cromatografía de captura AX.

En general, la etapa de captura puede considerarse como una etapa de acondicionamiento para mejorar el rendimiento de la etapa intermedia. Concentra el producto y cambia significativamente la matriz de la carga. Además, se observó una fuerte reducción de la endotoxina (en alrededor del 97 %) y una reducción moderada del ADN y la PCH.

### 25 1.1.3 Cromatografía de afinidad intermedia

El conjunto de elución AX obtenido (250 ml/L<sub>usp</sub>) se filtra (Sartopore2 0,45-0,2  $\mu\text{m}$ ) antes de la cromatografía intermedia.

30 El conjunto de filtrado AX se diluye posteriormente 8 veces (tampón de dilución: 20 mM Tris, pH 7,4; Tween80 al 0,1 %; 2 mM CaCl<sub>2</sub>). La dilución con calcio permite que la anexina A5 se una a la cromatografía de heparina inmovilizada. Esta interacción es lenta en comparación con una interacción iónica. El tiempo de contacto es crítico y, por lo tanto, la cromatografía se realiza con  $\leq$  100 cm/h.

Se llevan a cabo dos etapas de lavado. La etapa de lavado 1 se realiza para 15 VC (20 mM Tris, pH 7,4; Tween80 al 0,1 %; 2 mM CaCl<sub>2</sub>), seguida de una segunda etapa de lavado para 2 VC con tampón que no contiene calcio (20 mM Tris, pH 7,4; Tween80 al 0,1 %).

35 La elución se realiza con una elución por etapas utilizando un tampón que contiene EDTA (20 mM Tris, pH 7,4; Tween80 al 0,1 %; 10 mM EDTA; 25 mM NaCl) que quelata los iones de calcio. La reacción quelante específicamente eluye la anexina A5, que solo puede unirse a la heparina en presencia de calcio. Para permitir una elución concentrada, el caudal se redujo a  $\leq$  60 cm/h en la elución. El pico de elución completo se recoge a partir del aumento de la señal UV a 0,05 UA a 0,05 UA en el pico descendente, lo que representa aproximadamente 7 VC. El perfil de elución demuestra un solo pico agudo.

40 Se lleva a cabo un procedimiento CIP de dos etapas para regenerar y limpiar la columna (Etapa 1: 2 M NaCl para 3 VC 100 cm/h; flujo ascendente / Etapa 2: 0,1 M NaOH, 3 VC; incubación durante >15 h, 40 cm/h de flujo

ascendente). La columna se almacena finalmente en 1 M NaCl en 25 % EtOH.

La Figura 1 muestra el diagrama de flujo del procedimiento para la cromatografía de afinidad intermedia.

La etapa intermedia es la etapa de purificación más poderosa en el esquema del procedimiento. La anexina A5 se une a los iones de calcio. En este estado de unión al calcio, el producto puede formar una unión altamente específica con la heparina. Solo las formas de anexina A5 correctamente plegadas que tienen la capacidad de formar complejos con el calcio pueden unirse a la Heparina. De este modo, la etapa cromatográfica puede discriminar entre un producto correctamente plegado y un producto mal plegado. Además, la etapa intermedia alcanza altos factores de agotamiento, ya que la interacción altamente específica se combina con un modo de elución específico mediante la reacción del quelato del calcio con EDTA. Por lo tanto, se observa una fuerte reducción de la endotoxina (una reducción adicional de aproximadamente el 99 %) y de PCH, combinada con una reducción moderada del contenido de ADN.

El efecto reductor de la endotoxina combinada de la primera etapa de captura de AX (aproximadamente el 97 %) y la etapa de cromatografía de afinidad intermedia (aproximadamente el 99 %) proporciona un producto de anexina A5 en el que los niveles de endotoxinas se reducen a aproximadamente el 0,03 % de los niveles en el producto aclarado antes del primer paso AX.

#### 1.1.4 Pulido - Cromatografía AX

El conjunto de elución de AF obtenido (300 ml/L<sub>USP</sub>) se diluye 2 veces (35 mM Tris, pH 8; Tween80 al 0,1 %; 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>) y se filtra (Sartopore2 0,45-0,2 µm) antes de la cromatografía de pulido. La dilución reduce la conductividad de la carga de AX, pero también compleja las moléculas de EDTA libres con iones de Mg. De lo contrario, el EDTA libre se une a la columna, lo que reduce principalmente la capacidad, pero también la separación en esta etapa.

La resina de pulido es Source15 Q con un diámetro promedio de resina de 15 µm. Es una resina de pulido de alta resolución que tiene la desventaja de una alta contrapresión. Por lo tanto, la cromatografía se realiza con 100 cm/h. La carga debe ser <16 g/L de resina para permitir una resolución adecuada.

El lavado después de la carga se realiza con tampón A (20 mM Bis-Tris pH 7; 25 mM NaCl) durante 3 VC. La elución se realiza utilizando un gradiente lineal al 100 % de B (20 mM Bis-Tris pH 7; 180 mM NaCl) en 33 VC. Esta etapa cromatográfica está diseñada principalmente para la eliminación de impurezas relacionadas con el producto. Diferentes formas de anexina A5 eluyen del 40-100 % B comenzando con un pico principal, un segundo pico reducido y varios picos más pequeños que siguen.

Se recoge el primer pico principal que comienza en 0,05 UA al valle entre el pico 1 y el pico 2, lo que representa aproximadamente 7 VC.

Se lleva a cabo un procedimiento de CIP de dos etapas regenerar y limpiar la columna (Etapa 1: 2 M NaCl para 3 VC 100 cm/h; flujo ascendente / Etapa 2: 1 M NaOH, 3 VC; incubación durante >15 h, 40 cm/h de flujo ascendente). La columna finalmente se almacenó en 25 mM NaCl.

Resultados recientes obtenidos en experimentos a pequeña escala indicaron efectos positivos de Tween80. Un procedimiento realizado con Tween80 al 0,1 % aumentó el rendimiento del producto después del intermedio en aproximadamente un 30 %. La carga en la etapa de pulido se limita a 16 g/L de resina para garantizar una adecuada resolución. La mejora en el rendimiento también tiene un impacto en el escenario de ampliación de escala. La dimensión de columna calculada en la etapa de pulido se planificó con dos ciclos. El aumento del rendimiento hace que sea necesario un escenario de 4-5 ciclos, si se procesa una cantidad total de la escala 100 L<sub>USP</sub>.

La Figura 2 muestra el diagrama de flujo del procedimiento para el paso de la cromatografía de pulido AX.

La etapa de pulido se implementa principalmente para la reducción de las impurezas relacionadas con el producto, por ejemplo, la separación de diferentes isoformas de anexina A5. Además, la etapa de pulido alcanza el factor de agotamiento más alto en el procedimiento para el ADN residual y reduce en gran medida la PCH. La endotoxina, que ya se encuentra en un nivel bajo después de la etapa intermedia, se reduce aún más en aproximadamente un 99 %, lo que lleva los niveles de endotoxinas a aproximadamente el 0,0003 % de los niveles en el producto aclarado antes del primer paso de AX.

#### 1.1.5 Ultra/diafiltración y formulación de anexina A5

El conjunto de AX se transfiere directamente a la UF/DF para elevar la concentración del producto y realizar un cambio de tampón. Tras el cambio del tampón, se añade Tween80 a una concentración final del 0,05 % y la sustancia farmacéutica se filtra de forma estéril.

En una primera etapa del procedimiento, el grupo de AX se concentra 6-8 veces. Después de esto, se realiza un cambio de tampón con 8-10 volúmenes de diafiltración en un tampón de formulación que no contiene Tween (20 mM Bis-Tris, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7 o pH 7,4). Después del cambio de tampón, se lleva a cabo una segunda

concentración para lograr una concentración final de 12 g/L. Esto permite la adición del primer lavado del casete y la adición de Tween80 a una concentración final de 0,05 % para alcanzar una concentración final después de la filtración estéril de 10 g/L. La etapa UF/DF se realiza con un TMP bajo de 0,9-1,1 bar para minimizar la formación de la capa de cobertura.

5 La Figura 3 muestra el diagrama de flujo del procedimiento de ultra/diafiltración y formulación de anexina A5.

**2 Valores objetivo y criterios de aceptación**

Los siguientes valores objetivo y los criterios de aceptación se definen para evaluar el rendimiento del procedimiento y la ampliación en comparación con las ejecuciones de DSP a pequeña escala. Los valores objetivo se definen sobre la base del análisis de IPC/Bulk de una ejecución piloto. Los parámetros clave del procedimiento se caracterizaron para especificar las etapas clave del procedimiento y mejorar la fiabilidad de su rendimiento.

10

**2.1 Principales parámetros del procedimiento**

La Tabla 5 muestra los principales parámetros del procedimiento. El logro de los rangos objetivo durante el desempeño del procedimiento es indicativo del éxito de la ampliación del mismo.

**Tabla 5: Parámetros de procedimiento de etapas de procedimiento y valores objetivo respectivos**

Etapa	Parámetro	Rango objetivo
Homogeneización	Temperatura post homogeneización	34-40 °C
	presión	600 bar
	ciclos	3
	Coefficiente de resuspensión	1 g/10 mL
Etapa de captura, cromatografía AX (Q Sepharose XL)	Cantidad de carga [g/L <sub>Resina</sub> ] [10 L <sub>USP</sub> /L <sub>Resina</sub> ]	30 - 50 10 - 12
	Criterio de elución [UV280, 2mm]	Conjunto pico principal (0,1 UA-0,2 UA)
	Volumen de elución [VC]	5-10
Etapa intermedia, cromatografía AF (Heparin HyperD)	Cantidad de carga [g/L Resin]	20-30
	Criterio de elución [UV280, 2mm]	Conjunto pico completo (0,1 UA - 0,1 UA)
	Criterio de elución [VC]	2-3
Etapa de Pulido, cromatografía AX (Source15 Q)	Cantidad de carga [g/L Resin]	10 - 23
	Criterio de elución [UV280, 2mm]	Pico principal a partir de 0,05 UA hasta el valle entre el pico 1 y el pico 2
UF/DF - Hydrosart 10 KDa	Volumen de elución [VC]	5-10
	Presión de entrada [bar]	0,8 – 1,2

15

**2.2 Parámetros clave del procedimiento**

Es importante un alto grado de homogeneidad de la suspensión antes de la cromatografía de captura. El uso de tres ciclos de homogeneización es adecuado para lograrlo. Además, un aumento de temperatura dentro de la homogeneización es adecuado para obtener temperaturas de lavado en el intervalo de 37 °C. Esto es importante para la actividad de la Benzonasa que tiene un impacto directo en el rendimiento de la etapa de filtración y la captura.

20

La combinación de la etapa de pulido también es importante, ya que esta etapa se utiliza para la separación de impurezas relacionadas con el producto. La etapa UF/DF se realiza en condiciones moderadas con respecto a TMP para minimizar la formación de una capa de cobertura.

25

**Tabla 6: Parámetros importantes del procedimiento**

Etapa	Parámetro	Rango objetivo
homogeneización	Temperatura post homogeneización	34-40 °C
homogeneización	Tiempos de ciclo	3
Pulido	Carga	10-16 g/L Resin
Acumulación tras el pulido	Señal UV (2mm)	Pico principal a partir de 0,05 UA hasta el valle entre el pico 1 y el pico 2
UF/DF	TMP	0,9-1,1 bar

**2.3 Controles durante el procedimiento**

La Tabla 7 muestra los controles durante el procedimiento. Los rangos objetivo alcanzados durante el desempeño

del procedimiento muestran una escalada exitosa del mismo. Los rangos objetivo se establecieron en función de las observaciones en ejecuciones previas a pequeña escala, que se realizaron solo con los cambios implementados.

Nomenclatura de las etapas:		Prueba	Laboratorio	Rango objetivo
Procedimiento 3 L	Procedimiento 100 L			
Resuspensión para homogeneización  IPC-D01	Resuspensión para homogeneización  IPC-03,1	Contenido: SDS-PAGE [g/L]	Bioanalytics HH	> 5 g/L USP
		SDS-PAGE (fracción soluble e insoluble en rojo. Gel) [relación en sol/insol en %]	Bioanalytics HH	< 40 % insoluble
Disrupción celular (después del ciclo 3)  IPC-D05	Disrupción celular (después del ciclo 3)  IPC-03	Contenido: SDS-PAGE [g/L]	Bioanalytics HH	> 5 g/L USP
		SDS-PAGE (fracción soluble e insoluble en rojo. Gel) [relación en sol/insol en %]	Bioanalytics HH	< 40 % insoluble
Aclarado IPC-D07	Aclarado IPC-04	Contenido: SDS PAGE [g/L]	Bioanalytics HH	n.a.
Acondicionamiento para captura  IPC-D07a	Dilución en línea para captura  IPC-05,1	Contenido: SDS PAGE [g/L]	Bioanalytics HH	t.b.d.
		Identidad: SDS-PAGE Coomassie	Bioanalytics HH	t.b.d.
		Pureza: PCH (WB)	Bioanalytics HH	band pattern
		Pureza: PCH (ELISA) [ng/mg]	Bioanalytics HH	t.b.d.
Acondicionamiento para captura  IPC-D07a	Dilución en línea para captura  IPC-05,1	Pureza: DNA (qPCR) [pg/mg]	Bioanalytics HH	t.b.d.
		Pureza: Endotoxina [EU/mg]; [EU/mL]	L+S	t.b.d.
AX captura FT IPC-D08	AX captura FT IPC-05,2	Identidad: SDS-PAGE Coomassie	Bioanalytics HH	patrón de banda
Conjunto de elución captura AX	Conjunto de elución captura AX	Contenido: AX-HPLC [g/L]	PANATecs	n.a.
IPC-D09	IPC-05	Contenido: SDS PAGE [g/L]	Bioanalytics HH	t.b.d.
		Identidad: SDS-PAGE Coomassie	Bioanalytics HH	patrón de banda
		Identidad: IEF	Bioanalytics HH	patrón de banda
		Pureza: PCH (WB)	Bioanalytics HH	patrón de banda
		Pureza: PCH (ELISA) [ng/mg]	Bioanalytics HH	t.b.d.
		Contenido: UV280 [g/L]	QC H	t.b.d.
		Pureza: DNA (qPCR) [pg/mg]	Bioanalytics HH	Reducido en comparación con IPC-D07a
		Pureza: Endotoxina [EU/mg]; [EU/mL]	L+S	Reducido en comparación con IPC-D07a
		Pureza: AX-HPLC [%]	PANATecs	t.b.d.

(continuación)

Nomenclatura de las etapas:		Prueba	Laboratorio	Rango objetivo
Procedimiento 3 L	Procedimiento 100 L			
AX captura Salt CIP IPC-D10	AX captura Salt CIP IPC-05,3	Análisis opcional	Bioanalytics HH	n.a.
0,2 µm filtración del conjunto de captura IPC-D11	0,2 µm filtración del conjunto de captura IPC-06,1	n.a.	Bioanalytics HH	n.a.
Acondicionamiento para AF intermedia IPC-D12	Acondicionamiento para AF intermedia IPC-06,2	Contenido: AX-HPLC [g/L]	PANATecs	n.a.
AF intermedia FT+ lavado IPC-D13	AF intermedia FT IPC-06,3	Contenido: AX-HPLC [g/L]	PANATecs	n.a.
		Identidad: SDS-PAGE Coomassie	Bioanalytics HH	patrón de banda
conjunto de elución AF intermedia IPC-D14	conjunto de elución AF intermedia IPC-06	Contenido: AX-HPLC [g/L]	PANATecs	n.a.
		Contenido: UV280 [g/L]	QC H	t.b.d.
		Identidad: SDS-PAGE Coomassie	Bioanalytics HH	patrón de banda
		Identidad: IEF	Bioanalytics HH	patrón de banda
		Pureza: PCH (WB)	Bioanalytics HH	patrón de banda
		Pureza: PCH (ELISA) [ng/mg]	Bioanalytics HH	Reducido en comparación con IPC-D09
		Pureza: DNA (qPCR) [pg/mg]	Bioanalytics HH	Reducido en comparación con IPC-D09
		Pureza: Endotoxin [EU/mg]; [EU/mL]	L+S	Reducido en comparación con IPC-D09
		Pureza: AX-HPLC [%] Pureza: SEC [%]	PANATecs QC BV	t.b.d. t.b.d.
0,2 µm filtración del conjunto intermedio IPC-D17	0,2 µm filtración del conjunto intermedio IPC-07,1	Análisis opcional	Bioanalytics HH	n.a.
AX pulido FT+ lavado IPC-D18	AX pulido FT IPC-07,2	Identidad: SDS-PAGE Coomassie FQKA-HB005	Bioanalytics HH	patrón de banda
AX pulido Salt CIP IPC-D20	AX pulido Salt CIP IPC-07,3	Análisis opcional	Bioanalytics	n.a.
-	AX fracción de pulido IPC-07,4	Identidad: IEF	Bioanalytics HH	patrón de banda
		Pureza: AX-HPLC [%]	PANATecs	t.b.d.
-	AX fracción de pulido IPC-07,5	Identidad: IEF	Bioanalytics HH	patrón de banda
		Pureza: AX-HPLC [%]	PANATecs	t.b.d.
-	AX fracción de pulido IPC-07,6	Identidad: IEF	Bioanalytics HH	patrón de banda
		Pureza: AX-HPLC [%]	PANATecs	t.b.d.
-	AX fracción de pulido IPC-07,7	Identidad: IEF	Bioanalytics HH	patrón de banda
		Pureza: AX-HPLC [%]	PANATecs	t.b.d.
conjunto elución pulido AX IPC-D19	conjunto elución pulido AX IPC-07	Contenido: AX-HPLC [g/L]	PANATecs	t.b.d.
		Contenido: UV280 [g/L]	QC H	t.b.d.
		Identidad: SDS-PAGE Coomassie	Bioanalytics HH	patrón de banda
		Identidad: IEF	Bioanalytics HH	patrón de banda

(continuación)

Nomenclatura de las etapas: Procedimiento 3 L      Procedimiento 100 L		Prueba	Laboratorio	Rango objetivo
		Pureza: PCH (WB)	Bioanalytics HH	patrón de banda
		Pureza: PCH (ELISA) [ng/mg]	Bioanalytics HH	Reducido en comparación con IPC-D14
		Pureza: DNA (qPCR) [pg/mg]	Bioanalytics HH	Reducido en comparación con IPC-D14
		Pureza: Endotoxina [EU/mg]; [EU/mL]	L+S	Reducido en comparación con IPC-D14
		Pureza: AX-HPLC [%]	PANATecs	t.b.d.
		Pureza: SEC [%]	QCH	t.b.d.
<b>Post concentración</b> <b>IPC-D21</b>	<b>Post concentración</b> <b>IPC-08,1</b>	Análisis opcional	Bioanalytics	n.a.
<b>Post diafiltración/conc.</b> <b>IPC-D22</b>	<b>Post diafiltración/ conc.</b> <b>IPC-08,2</b>	Contenido: UV280 [g/L]	QC H	t.b.d.
<b>Adición posterior de lavado de casete y adición de Tween80</b> <b>IPC-D23</b>	<b>Adición posterior de lavado de casete</b> <b>IPC-08,3</b>	Contenido: UV280 [g/L]	QC H	t.b.d.
<b>Materiales incluyendo Tween80</b> <b>IPC-D24</b>	<b>Materiales incluyendo Tween80</b> <b>IPC-08</b>	Contenido: UV280 [g/L]	QC H	> 10 g/L
		Identidad: SDS PAGE red.	Bioanalytics HH	Confirma la referencia
		Identidad: IEF	Bioanalytics HH	Banda principal corresponde a la referencia
		Contenido: UV280 [g/L]	QC H	8-12 g/L
		Pureza: PCH (WB)	Bioanalytics HH	Patrón de banda
		Pureza: PCH (ELISA) [ng/mg]	Bioanalytics HH	100 ng/mg
		Pureza: DNA (qPCR) [pg/mg]	Bioanalytics HH	100 ng/mg
		Pureza: Endotoxin]	L+S	35 EU/mg
<b>A granel filtrado estéril</b> <b>IPC-D25</b>	<b>A granel filtrado estéril</b> <b>IPC-09</b>	Pureza: AX-HPLC [%]	PANATecs	t.b.d.
		Pureza: SEC [%]	QC BV	> 95
		Carga biológica Ph. Eur. 2.6.12	L+S	< 1 cfu/mL
		Potencia	Bioassay HH	t.b.d.
		pH	QC- Hannover	6,8 – 7,2
		Apariencia	QC- Hannover	Transparente, incolore, libre de partículas visibles
		Pureza: SDS PAGE no rojo. Plata	QC BV	> 90 %
		Contenido: AX-HPLC [g/L]	PANAT ecs	t.b.d.
		Identidad: Western Blot	Bioanalytics HH	Banda principal corresponde a la referencia
		Osmolalidad	TECHPharm	t.b.d.

## 3 Conclusiones

El procedimiento de fabricación anterior está bien adaptado para la fabricación a gran escala sin cuellos de botella para escalar hasta 10.000 L y más, si es necesario.

5 Después de una prueba piloto utilizando un 200 L escalado en una planta piloto GMP, el procedimiento dio un producto que tenía 1,8 pg de ADN de la célula huésped por mg de proteína AnxA5; 16,6 ng de proteína de la célula huésped por mg de proteína AnxA5; y 0,1 EU por mg de proteína AnxA5.

A lo largo del procedimiento de fabricación, la proteína anexina A5 se mantiene en solución en su forma activa cuando no se une temporalmente a resinas de cromatografía.

10 Según se aplica a un cultivo de 1.000 L, el tiempo total del procedimiento en la planta de fabricación será de una semana en la fermentación, cosecha, ruptura de células y procesamiento de cromatografía previa y una semana consecutiva en el procesamiento posterior. Todo el procedimiento en una planta GMP será de 2 semanas. Esto es independiente de la escala y se adapta perfectamente a los estándares de la industria y se ajustaría a cualquier CMO o fabricante farmacéutico.

Como se señaló anteriormente, en comparación, el procedimiento de Marder y col. emplearía alrededor de 12 semanas para procesar un cultivo de 1.000 L.

15 Además, el rendimiento en el presente procedimiento es 2-3 veces mayor por lote que el de Marder y col. Esto hace que el coste de fabricación por gramo de sustancia de fármaco anexina A5 se encuentre entre (6-8 x 2-3 =) 12-24 tiempos más altos para el procedimiento de Marder.

20 Asimismo, además de proporcionar un procedimiento de purificación que es más rápido y con mayor rendimiento que el procedimiento de Marder y col., el procedimiento de la presente invención también proporciona un producto de mayor pureza. Como se analizó anteriormente en el Ejemplo Comparativo 1, la pureza de la proteína del procedimiento de Marder no sería adecuada para uso humano. A pesar de las centrifugaciones elaboradas, en el procedimiento de Marder solo se utiliza una etapa de cromatografía de intercambio aniónico, lo que está muy por debajo de los requisitos para alcanzar la pureza suficiente con respecto a las impurezas relacionadas con el procedimiento (especialmente la endotoxina) y las variantes relacionadas con el producto. Marder no muestra ningún dato sobre los niveles de endotoxinas u otras impurezas que indiquen una falta de idoneidad para uso farmacéutico.

En contraste, el procedimiento de la presente solicitud proporciona un producto de proteína anexina A5 de alta pureza, que tiene las características que se enumeran a continuación:

- una concentración generalmente alrededor de 8-12 g/L;
- niveles de proteína de la célula huésped iguales o inferiores a 100 ng/mg, más normalmente inferiores a 20 ng/mg (según determinado por ELISA);
- niveles de ADN de la célula huésped iguales o inferiores a 100 pg/mg, más normalmente inferiores a 10 pg/mg;
- endotoxina igual o inferior a 35 EU/mg, más normalmente inferior a 1 EU / mg,
- una pureza de >95 % según determinado por cromatografía de exclusión por tamaño;
- una carga biológica de <1 cfu/mL (según determinado por Ph. Eur. 2.6.12);
- una apariencia clara, incolora, libre de partículas visibles; y
- en la que la banda principal detectada por el análisis western blot corresponde a la referencia de la anexina A5.

40 El procedimiento se repitió utilizando Capto Q ImpRes para la segunda etapa de pulido en lugar de Source 15Q. Esto proporcionó un procedimiento aún más eficaz, ya que la resina de intercambio aniónico Capto Q ImpRes tiene una alta capacidad de unión, tolera altos caudales con baja contrapresión, puede empaquetarse a una mayor altura del lecho y tiene un precio más bajo. Se mantuvo la calidad y pureza del producto final.

En comparación con Source 15Q, la resina Capto Q ImpRes:

- Tiene más del doble de capacidad en términos de gramo/litro de resina.
- Tolera un caudal más de dos veces superior a la misma contrapresión
- Se puede empaquetar a alturas de lecho más altas, generalmente alrededor de un 35-60 % más, lo que proporciona una mayor capacidad para una huella de columna dada; y
- Cuesta menos de la mitad del precio de compra por litro de resina

### **Ejemplo 2**

50 El ejemplo ilustró una comparación de la captura de intercambio aniónico (AX) y la captura de afinidad por cromatografía de heparina.

La captura AX y la cromatografía de captura por afinidad con heparina se compararon con respecto al rendimiento y la pureza de la anexina A5 en el eluato de captura. Ambas estrategias fueron comparadas en experimentos por lotes bajo condiciones optimizadas.



Parámetros de prueba:

Cromatografía AX:

- 5 Modo por lotes 500 µl de resina (75 % de suspensión)  
 Tampón AX A: 20 mM Fosfato de sodio, pH 7, 5 mM EDTA, 250 mM NaCl  
 Tampón AX B: 20 mM Fosfato de sodio pH 6,5, 5 mM EDTA  
 Cromatografía AX: Carga: 10 mL de lisado prefiltrado.  
 CIP: 1 M NaOH

Cromatografía de afinidad de heparina:

- 10 Modo por lotes 500 µl de resina (75 % de suspensión)  
 Carga: 10 ml de lisado prefiltrado; +10 mM CaCl<sub>2</sub>  
 Tampón AF A: Tris 50 mM pH 7,4, CaCl<sub>2</sub> 5 mM  
 Tampón AF B: Tris 50 mM pH 7,4, EGTA 40 mM, NaCl 50 mM  
 CIP: 3 M NaCl

**Tabla 7: mparación de la captura de cromatografía por afinidad heparina y AX**

	Resina	Recuperación (%)	Pureza (determinada sobre la base de SDS-PAGE- R&D) (%)
AX	Q Sepharose XL	70-90	10-20
Afinidad	Heparin Hyper D	30-40	85-95
Afinidad (tras AX)	Heparin Hyper D (Q Sepharose XL)	70-80	85-95

- 15 Estos resultados demuestran que realizar una captura de AX antes de la cromatografía de afinidad no mejora significativamente la pureza, pero tiene una influencia considerable en el rendimiento de la etapa con heparina. Además, la costosa resina de afinidad podría tener una vida útil prolongada si se utiliza como una etapa intermedia. El rendimiento es de gran importancia.
- 20 La captura por AX podría clasificarse como una etapa de acondicionamiento que permite un uso eficaz de la etapa de afinidad altamente específica mediante cromatografía de heparina.

**Ejemplo 3**

Se obtuvo un producto de anexina A5 parcialmente purificado utilizando procedimientos similares al Ejemplo 1, hasta la primera etapa de captura por cromatografía de intercambio aniónico.

- 25 En resumen, se resuspendieron E. coli recombinantes que expresan anexina A5 en un tampón de homogeneización (50 mM Tris, 1 mM MgCl, Tween20 al 1 %, pH 7,5), con 3200 U de Bezonase y se homogeneizaron con tres ciclos de presión de 600 bar. La temperatura posterior a la homogeneización se midió a 36 °C. Se realizó una etapa de aclarado con Cuno 60 SP 0,6-0,2 µm, y la solución aclarada se diluyó 1:2 en Tween20 al 1 %, con la adición de EDTA. El acondicionamiento posterior para la captura de la solución tuvo un pH de 6,9 y una conductividad de 2,7
- 30 mS/cm. El intercambio aniónico se realizó con Q Q Sepharose XL (GE), se lavó con Tampón A (20 mM Tris, 25 mM NaCl, 0,1 % Tween20, pH 7,4) y luego se eluyó con Tampón B (20 mM Tris, 300 mM NaCl, 0,1 % Tween20, pH 7,4). El producto resultante se filtró luego de forma estéril con un filtro de 0,2 µm.

El producto de intercambio aniónico filtrado estéril resultante se purificó utilizando cromatografía de afinidad de heparina y se probaron diferentes condiciones.

- 35 Las condiciones de cromatografía de afinidad de heparina utilizadas fueron las siguientes:

Heparin HyperD M	50 mL CV
Volumen de carga diluida (mL)	1173
Volumen después de la carga (mL)	5
Volumen de flujo a través (mL)	1145
Volumen de la piscina de elución simulada (A5-B6) 50 hasta 50 mAU en el pico descendente) (mL) -UV 2 mm-	150
Volumen de muestras (mL)	-
Caudal (cm/h)	100 (elución 60)

La filtración estéril del conjunto de elución de captura se realizó con Sartopore 2 0,45-0,2 µm. Este conjunto se

diluyó 8 veces con (1050 ml) de tampón A de cromatografía de heparina. El conjunto resultante tenía un pH de 7,4 y una conductividad de 6,8 mS. La elución se llevó a cabo utilizando un caudal reducido de 60 cm/h.

Las pruebas 1 y 2 se realizaron para determinar el impacto de Tween80 utilizando el tampón A para el lavado y el tampón B para la elución, como se indica a continuación

5 Prueba 1:

Tampón A 20 mM Tris, 25 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, Tween20 al 0,1 %, pH 7,4

Tampón B 20 mM Tris, 10 mM EDTA, 25 mM NaCl, Tween20 al 0,1 %, pH 7,4

Prueba 2:

10 Tampón A 20 mM Tris, 25 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, Tween20 al 0,1 %, Tween80 al 0,1 % pH 7,4  
Tampón B 20 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, Tween20 al 0,1 %, Tween80 al 0,1 % pH 7,4

Los resultados para la Prueba 1 se muestran en la Figura 7A, y los resultados para la Prueba 2 se muestran en la Figura 7B.

15 Los resultados muestran que la adición de Tween80 modificó la elución a un solo pico, en contraste con la elución separada en condiciones estándar (Prueba 1). Tween80 parece estabilizar la anexina A5. Una posible explicación para el cambio en el comportamiento de elución es que se evita una precipitación teórica en la columna. Se pueden describir dos efectos positivos principales para el uso de Tween80 en la etapa de cromatografía de afinidad con heparina:

- 20 - Presión reducida: la presión en la columna, que aumentó en la carga de 0,5 a 2-3 bar, se redujo claramente a 0,5 bar. Esto es especialmente beneficioso para la gran escala. La leve precipitación que se observa después de una incubación prolongada podría ser la razón del aumento de la presión.
- 25 - Prevención de la precipitación: el segundo efecto positivo se observa en la elución. Dentro del fraccionamiento de la elución, las fracciones principales de pico altamente concentradas tienen tendencia a precipitar. Después del agrupamiento de las fracciones, ya no se observa precipitación, suponiendo que este efecto tiene que ver con la concentración muy alta de anexina A5 en el pico principal. Además, la precipitación parece ser reversible. La precipitación en el pico principal no se pudo evitar mediante una concentración elevada de sal en la elución. En contraste, la adición de Tween80 también previno la formación de precipitados en las fracciones principales de pico.

Basándose en estos resultados, parece ventajoso añadir adicionalmente Tween80 en todos los tampones de cromatografía intermedia, ya que tiene un efecto estabilizador sobre la anexina A5.

30 **Ejemplo 4**

Se obtuvo un producto de anexina A5 parcialmente purificado utilizando procedimientos similares al Ejemplo 1, hasta la primera etapa de captura por cromatografía de intercambio aniónico.

35 [A continuación, se mezclaron 1,25 ml del producto de la etapa de intercambio aniónico con 8,75 ml de diferentes formas de tampón de dilución de prueba. Las mezclas se incubaron luego a temperatura ambiente y se evaluaron visualmente después de 30 minutos, 18 horas y 4 días.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla

enfoque	Tampón de dilución	Punto de tiempo 1 (30 min)	Punto de tiempo 2 (18 h)	Punto de tiempo 3 (4 días)
A	20 mM Tris, 25 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,1 % Tween 20 pH 7,4	Opalescencia clara apenas detectable	Primeros signos opalescentes de precipitación	Opalescente y parcialmente precipitado
B	20 mM Tris, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,1 % Tween 20 pH 7,4	Opalescencia clara apenas detectable	Primeros signos opalescentes de precipitación	Opalescente y parcialmente precipitado
C	200 mM Glycin, 20 mM Tris, 25 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,1 % Tween 20 pH 7,4	Opalescencia clara apenas detectable	Primeros signos opalescentes de precipitación	Opalescente y parcialmente precipitado
D	200 mM Arginin, 20 mM Tris, 25 mM NaCl, 2mM CaCl <sub>2</sub> , 0,1 % Tween 20, pH 7,4	Opalescencia clara apenas detectable	Primeros signos opalescentes de precipitación	Opalescente y parcialmente precipitado
E	20 mM Tris, 25 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,1 % Tween 20, 0,1% Tween 80, pH 7,4	Opalescencia clara apenas detectable	Primeros signos opalescentes de precipitación	Opalescente sin signos de precipitación

(continuación)

enfoque	Tampón de dilución	Punto de tiempo 1 (30 min)	Punto de tiempo 2 (18 h)	Punto de tiempo 3 (4 días)
F	20 mM Tris, 25 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.1 % Tween 20 pH 8,0	Opalescencia clara apenas detectable	Primeros signos opalescentes de precipitación	Opalescente y parcialmente precipitado

5 Estos resultados mostraron el beneficio de añadir Tween 80 (es decir, polisorbato 80) para evitar la precipitación del producto en una muestra. Esto es importante en el contexto del acondicionamiento de un producto AnxA5 antes de la aplicación a una columna cromatográfica, tal como una columna de cromatografía de afinidad, para reducir la precipitación y evitar aumentos en la contrapresión cuando se ejecuta la columna.

**Listado de secuencias**

- 10 <110> Annexin Pharmaceuticals AB
- <120> Procedimiento de fabricación
- <130> ANNBE/P61806PC
- 15 <150> GB 1516516.0
- <151> 2015-09-17
- <160> 2
- 20 <170> BiSSAP 1.2
- <210> 1
- <211> 320
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 25 <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos de anexina A5 humana
- 30 <400> 1

Met	Ala	Gln	Val	Leu	Arg	Gly	Thr	Val	Thr	Asp	Phe	Pro	Gly	Phe	Asp
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Asp	Ala	Glu	Thr	Leu	Arg	Lys	Ala	Met	Lys	Gly	Leu	Gly
			20					25					30		
Thr	Asp	Glu	Glu	Ser	Ile	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Ser	Asn	Ala
		35					40					45			
Gln	Arg	Gln	Glu	Ile	Ser	Ala	Ala	Phe	Lys	Thr	Leu	Phe	Gly	Arg	Asp
	50					55					60				
Leu	Leu	Asp	Asp	Leu	Lys	Ser	Glu	Leu	Thr	Gly	Lys	Phe	Glu	Lys	Leu
65					70					75					80
Ile	Val	Ala	Leu	Met	Lys	Pro	Ser	Arg	Leu	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Glu	Leu
				85					90					95	
Lys	His	Ala	Leu	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Glu	Lys	Val	Leu	Thr	Glu
			100					105					110		
Ile	Ile	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Ile	Lys	Gln	Val
		115					120					125			
Tyr	Glu	Glu	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Val	Val	Gly	Asp
	130					135					140				
Thr	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Met	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Gln	Ala	Asn
145					150					155					160
Arg	Asp	Pro	Asp	Ala	Gly	Ile	Asp	Glu	Ala	Gln	Val	Glu	Gln	Asp	Ala
				165					170					175	
Gln	Ala	Leu	Phe	Gln	Ala	Gly	Glu	Leu	Lys	Trp	Gly	Thr	Asp	Glu	Glu
			180				185						190		
Lys	Phe	Ile	Thr	Ile	Phe	Gly	Thr	Arg	Ser	Val	Ser	His	Leu	Arg	Lys
		195					200					205			
Val	Phe	Asp	Lys	Tyr	Met	Thr	Ile	Ser	Gly	Phe	Gln	Ile	Glu	Glu	Thr
	210					215					220				
Ile	Asp	Arg	Glu	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Leu	Ala	Val
225					230					235					240
Val	Lys	Ser	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Ala	Tyr	Leu	Ala	Glu	Thr	Leu	Tyr
				245					250					255	
Tyr	Ala	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Asp	His	Thr	Leu	Ile	Arg	Val
			260				265						270		
Met	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	Ile	Asp	Leu	Phe	Asn	Ile	Arg	Lys	Glu	Phe
		275					280					285			
Arg	Lys	Asn	Phe	Ala	Thr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Met	Ile	Lys	Gly	Asp	Thr
	290					295					300				
Ser	Gly	Asp	Tyr	Lys	Lys	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Glu	Asp	Asp
305					310					315					320

5 <210> 2  
 <211> 362  
 <212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>  
 <223> Amino acid sequence of human TIM-1

<400> 2

ES 2 699 155 T3

Met	His	Pro	Gln	Val	Val	Ile	Leu	Ser	Leu	Ile	Leu	His	Leu	Ala	Asp
1				5					10					15	
Ser	Val	Ala	Gly	Ser	Val	Lys	Val	Gly	Gly	Glu	Ala	Gly	Pro	Ser	Val
			20					25					30		
Thr	Leu	Pro	Cys	His	Tyr	Ser	Gly	Ala	Val	Thr	Ser	Met	Cys	Trp	Arg
		35					40					45			
Gly	Ser	Cys	Ser	Leu	Phe	Thr	Cys	Gln	Asn	Gly	Ile	Val	Trp	Thr	Asn
	50					55					60				
Gly	Thr	His	Val	Thr	Tyr	Arg	Lys	Asp	Thr	Arg	Tyr	Lys	Leu	Leu	Gly
65					70					75					80
Asp	Leu	Ser	Arg	Arg	Asp	Val	Ser	Leu	Thr	Ile	Glu	Asn	Thr	Ala	Val
				85					90					95	
Ser	Asp	Ser	Gly	Val	Tyr	Cys	Cys	Arg	Val	Glu	His	Arg	Gly	Trp	Phe
			100					105					110		
Asn	Asp	Met	Lys	Ile	Thr	Val	Ser	Leu	Glu	Ile	Val	Pro	Pro	Lys	Val
		115					120					125			
Thr	Thr	Thr	Pro	Ile	Val	Thr	Thr	Val	Pro	Thr	Val	Thr	Thr	Val	Arg
	130					135					140				
Thr	Ser	Thr	Thr	Val	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Val	Pro	Met	Thr	Thr	Val
145					150					155					160
Pro	Thr	Thr	Thr	Val	Pro	Thr	Thr	Met	Ser	Ile	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr
				165					170					175	
Val	Leu	Thr	Thr	Met	Thr	Val	Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Val	Pro	Thr	Thr
			180					185					190		
Thr	Ser	Ile	Pro	Thr	Thr	Thr	Ser	Val	Pro	Val	Thr	Thr	Thr	Val	Ser
		195					200					205			
Thr	Phe	Val	Pro	Pro	Met	Pro	Leu	Pro	Arg	Gln	Asn	His	Glu	Pro	Val
	210					215					220				
Ala	Thr	Ser	Pro	Ser	Ser	Pro	Gln	Pro	Ala	Glu	Thr	His	Pro	Thr	Thr
225					230					235					240
Leu	Gln	Gly	Ala	Ile	Arg	Arg	Glu	Pro	Thr	Ser	Ser	Pro	Leu	Tyr	Ser
				245					250					255	
Tyr	Thr	Thr	Asp	Gly	Asn	Asp	Thr	Val	Thr	Glu	Ser	Ser	Asp	Gly	Leu
			260					265					270		
Trp	Asn	Asn	Gln	Thr	Gln	Leu	Phe	Leu	Glu	His	Ser	Leu	Leu	Thr	Ala
		275					280					285			
Asn	Thr	Thr	Lys	Gly	Ile	Tyr	Ala	Gly	Val	Cys	Ile	Ser	Val	Leu	Val
	290					295					300				
Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Gly	Val	Ile	Ile	Ala	Lys	Lys	Tyr	Phe	Phe	Lys
305					310					315					320
Lys	Glu	Val	Gln	Gln	Leu	Ser	Val	Ser	Phe	Ser	Ser	Leu	Gln	Ile	Lys
				325					330					335	
Ala	Leu	Gln	Asn	Ala	Val	Glu	Lys	Glu	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Asn	Ile
			340					345					350		
Tyr	Ile	Glu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Ala	Thr	Asp						
		355					360								

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de recuperación y/o purificación de una proteína intracelular expresada de forma recombinante que comprende la secuencia de anexina A5 (AnxA5) de una célula huésped productora de endotoxina con una pared celular, comprendiendo el procedimiento la liberación de la proteína intracelular de la célula huésped,
- 5 **caracterizado porque** la etapa de liberación de la proteína AnxA5 intracelular se realiza en presencia de un tampón de homogeneización que comprende un detergente no iónico, y
- 10 preferentemente en el que el procedimiento no incluye ninguna etapa de centrifugación para la recuperación y/o purificación de la proteína AnxA5 después de su liberación de la célula huésped y/o en el que la proteína AnxA5 permanece en solución durante todo el procedimiento, excepto cuando se une temporalmente a alguna resina cromatográfica.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que:
- (a) el detergente no iónico es un polisorbato, preferentemente un polisorbato seleccionado entre Tween20 y Tween80, más preferentemente Tween80;
- 15 (b) la etapa de liberación de la proteína AnxA5 intracelular se realiza en presencia de un tampón de homogeneización que comprende una cantidad de detergente no iónico que es eficaz para reducir o prevenir la unión entre la anexina A5 y la endotoxina; y/o
- (c) la etapa de liberación de la proteína AnxA5 intracelular se realiza en presencia de un tampón de homogeneización que comprende de 0,01 a 10 % (p/p) de detergente no iónico, tal como de 0,02 a 5 % (p/p), de 0,05 a 2 % (p/p) o aproximadamente 1 % (p/p) de detergente no iónico.
- 20 3. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente para la recuperación y/o purificación de una proteína intracelular expresada de manera recombinante que comprende la secuencia de anexina A5 (AnxA5) de una célula huésped que tiene una pared celular, comprendiendo el procedimiento la liberación de la proteína AnxA5 intracelular de la célula huésped,
- 25 en el que la concentración de iones de calcio libre en el tampón de homogeneización en el momento de liberar la proteína AnxA5 intracelular de la célula huésped, o después de liberar la proteína AnxA5 intracelular de la célula huésped, pero antes de que ocurra cualquier purificación cromatográfica adicional, es inferior a 10 mM, preferentemente inferior a 5 mM, 1 mM, más preferentemente inferior a 500  $\mu$ M, o sustancialmente cero, y/o en el que el tampón de homogeneización comprende, o se modifica tras la liberación de la proteína AnxA5 intracelular para incluir, un quelante de iones metálicos de calcio.
- 30 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que:
- (a) el quelante de iones metálicos de calcio se selecciona entre EDTA o una sal del mismo, EGTA o una sal del mismo, y más preferentemente es EDTA;
- (b) el nivel de iones de calcio libre, y/o una cantidad de quelante de iones metálicos de calcio, es eficaz para reducir o prevenir la unión entre la anexina A5 y los componentes de la pared celular de la célula huésped;
- 35 (c) el tampón de homogeneización comprende, o se ajusta (antes o después de la liberación de la proteína AnxA5) para comprender, de 0,01 a 500 mM, tal como de 0,05 a 100 mM, de 0,5 a 20 mM, de 1 a 15 mM, de 2 a 10 mM o aproximadamente 4 mM de quelante de iones metálicos de calcio, y siendo el quelante de iones metálicos de calcio preferentemente EDTA; y/o
- 40 (d) el tampón de homogeneización comprende un detergente no iónico de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 2, preferentemente en el que el quelante de iones metálicos de calcio es EDTA y/o en el que el detergente no iónico es Tween80.
5. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el procedimiento comprende la recuperación y/o purificación de una proteína AnxA5 intracelular expresada de forma recombinante de un cultivo de las células huésped, y en el que el cultivo tiene un volumen de al menos 100 L, 500 L, 1.000 L, 5.000 L, o 10.000 L.
- 45 6. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa de liberación de la proteína AnxA5 intracelular crea un homogeneizado de biomasa que comprende la proteína AnxA5 liberada, y opcionalmente:
- (a) en el que el homogeneizado de biomasa comprende además una o más (generalmente todas) de las impurezas seleccionadas del grupo que consiste en proteínas de la célula huésped, componentes de la pared de la célula huésped, membrana de la célula huésped, ácido nucleico de la célula huésped y endotoxina; y/o
- 50 (b) en el que el procedimiento comprende además la etapa de aclarar el homogeneizado de biomasa y, por lo tanto, producir un producto aclarado que comprende la proteína AnxA5 liberada, por ejemplo, mediante el tratamiento del homogeneizado con una nucleasa y, opcionalmente, en el que la etapa de aclarado del homogeneizado de biomasa comprende (preferiblemente después del tratamiento con nucleasa), una etapa de filtración consistente en hacer pasar el homogeneizado de biomasa que comprende la proteína AnxA5 liberada a través de un filtro, y en el que el efluente del filtro es el producto aclarado que comprende la proteína AnxA5 liberada.
- 55 7. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, que comprende además la etapa de someter la proteína

AnxA5 liberada a una resina de intercambio aniónico para realizar una primera etapa de intercambio aniónico, y así producir un primer producto de intercambio aniónico que comprende la proteína AnxA5 liberada, y opcionalmente:

- 5 (a) en el que el producto aclarado que comprende la proteína AnxA5 liberada tal como se produce por el procedimiento de la reivindicación 6(b) que incluye la etapa de filtración opcional se somete a la primera etapa de intercambio aniónico, para producir así un primer producto de intercambio aniónico que comprende la proteína AnxA5 liberada;
- (b) en el que, antes de la primera etapa de intercambio aniónico, uno o más parámetros del entorno de la proteína AnxA5 liberada, seleccionados del grupo que consiste en el pH, la conductividad, el nivel de quelante de iones de calcio y el nivel de detergente no iónico, se ajusta o se ajustan;
- 10 (c) en el que la proteína AnxA5 liberada que se somete a la etapa de intercambio aniónico se formula a un pH de aproximadamente 6,9, una conductividad de aproximadamente 2,8 mS/cm, una concentración de quelante de iones de calcio de aproximadamente 1 mM y se diluye usando un detergente no iónico, por ejemplo, para obtener una concentración final de detergente no iónico de 0,01 a 1 % (p/v), más preferentemente de aproximadamente 0,1 % (p/v); y/o
- 15 (d) en el que la proteína AnxA5 se une durante la etapa de intercambio aniónico, y el primer producto de intercambio aniónico que comprende la proteína AnxA5 liberada se produce aplicando una solución de lavado y/o un tampón de elución a la resina de intercambio aniónico para liberar la proteína AnxA5 unida, opcionalmente en el que el tampón de elución comprende NaCl, por ejemplo, aproximadamente 300 mM NaCl.

8. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, que comprende además la etapa de someter la proteína AnxA5 liberada a una etapa de cromatografía de afinidad, para producir así un primer producto de cromatografía de afinidad que comprende la proteína AnxA5 liberada, y opcionalmente:

- (a) en el que la proteína AnxA5 en el primer producto de intercambio aniónico, tal como se produce por el procedimiento de la reivindicación 7, se somete a la etapa de cromatografía de afinidad, y además, opcionalmente, en el que:
- 25 i. un homogeneizado de biomasa que comprende la proteína AnxA5 liberada de acuerdo con la reivindicación 6, o 6(a), se aclara mediante el procedimiento de la reivindicación 6(b) y, de este modo, produce un producto aclarado que comprende la proteína AnxA5 liberada, y
- 30 ii. la proteína AnxA5 del producto aclarado se somete a una resina de intercambio aniónico para realizar una primera etapa de intercambio aniónico de acuerdo con la reivindicación 7 y así producir un primer producto de intercambio aniónico que comprende la proteína AnxA5, y
- iii. en el que la proteína AnxA5 en el primer producto de intercambio aniónico se somete a la etapa de cromatografía de afinidad;
- (b) en el que la etapa de cromatografía de afinidad comprende la unión de la proteína AnxA5 a heparina inmovilizada y, opcionalmente, en el que la unión es promovida por la presencia de iones de calcio y, además, opcionalmente, en el que la proteína AnxA5 se eluye de la heparina inmovilizada usando un tampón de elución que contiene un quelante de iones de calcio, tal como EDTA; y/o
- 40 (c) en el que el primer producto de cromatografía de afinidad comprende la proteína AnxA5 liberada y un quelante de iones de calcio, tal como EDTA o EGTA, opcionalmente en el rango de 0,1 a 500 mM, más preferentemente alrededor de 10 mM.

9. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, comprendiendo el procedimiento:

- someter una composición que comprende la proteína AnxA5 y un quelante de iones metálicos de calcio a una resina de intercambio aniónico para realizar una etapa de intercambio aniónico y así recuperar y/o purificar la proteína AnxA5 de la composición, y
- 45 en el que la etapa de intercambio aniónico se realiza en presencia de iones metálicos seleccionados adicionales, y
- en el que los iones metálicos seleccionados adicionales se seleccionan de modo que el quelante de iones metálicos de calcio tenga una afinidad de unión por los iones metálicos seleccionados que sea mayor que su afinidad de unión por la resina de intercambio aniónico, pero menor que su afinidad de unión por los iones de calcio; y
- 50 preferentemente, en el que la proteína AnxA5 permanece en solución durante todo el procedimiento, incluidas las etapas anteriores o posteriores, excepto cuando se une temporalmente a alguna resina cromatográfica, y
- opcionalmente, en el que los iones metálicos seleccionados se añaden a la composición antes o durante la etapa de intercambio aniónico.
- 55

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que:

- (a) el quelante de iones de metálicos calcio se selecciona entre EDTA o una sal del mismo, EGTA o una sal del mismo, y más preferentemente es EDTA;
- 60 (b) el quelante de iones metálicos de calcio está presente en la composición en exceso y/o en una concentración de aproximadamente al menos 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM o más;

- (c) los iones metálicos seleccionados son cationes divalentes, tales como los iones  $Mg^{2+}$ ;
- (d) los iones metálicos seleccionados están presentes durante la etapa de intercambio aniónico en una cantidad eficaz para reducir o prevenir una interacción entre el quelante de iones de calcio y la resina de intercambio aniónico durante el procedimiento de someter la composición a la resina de intercambio aniónico;
- 5 (e) los iones metálicos seleccionados están presentes durante la etapa de intercambio aniónico en una cantidad eficaz para aumentar la unión de la proteína AnxA5 a la resina de intercambio aniónico en presencia del quelante de iones de calcio y, por lo tanto, reducir la pérdida de la proteína AnxA5 en el flujo a través de la etapa de intercambio aniónico, en comparación con el nivel de pérdida observado cuando no hay iones metálicos seleccionados presentes durante la etapa de intercambio aniónico;
- 10 (f) los iones metálicos seleccionados están presentes durante la etapa de intercambio aniónico (por ejemplo, mediante la adición a la composición que comprende la proteína AnxA5 y un quelante de iones metálicos de calcio antes de someter la composición a la resina de intercambio aniónico) a una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mM, tal como de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mM o de
- 15 aproximadamente 12,5 mM; y / o
- (g) el quelante de iones de metálicos de calcio es EDTA y los iones metálicos seleccionados son iones  $Mg^{2+}$ , y preferentemente la relación molar de iones  $Mg^{2+}$  a EDTA está en el rango de 0.5:1 a 2:1, más preferentemente al menos 1:1 o más.
11. El procedimiento de la reivindicación 9 o 10, en el que la composición que comprende la proteína AnxA5 y un
- 20 quelante de iones de metálicos de calcio y que se somete a la resina de intercambio aniónico es el producto directo o indirecto de un procedimiento precedente que comprende la etapa de someter la proteína AnxA5 a una etapa de cromatografía de afinidad y eluir la proteína AnxA5 con un quelante de iones de calcio, produciendo así un producto de cromatografía de afinidad que es una composición que comprende la proteína AnxA5 y un quelante de iones de metálicos de calcio y opcionalmente:
- 25 (a) en el que la etapa de cromatografía de afinidad precedente comprende la unión de la proteína AnxA5 a heparina inmovilizada y, opcionalmente, en el que la unión es promovida por la presencia de iones de calcio y/o opcionalmente en el que la proteína AnxA5 se eluye de la heparina inmovilizada usando un tampón de elución que contiene un quelante de iones de calcio, tal como EDTA o EGTA; y/o
- 30 (b) en el que no hay una etapa de diálisis entre la etapa de cromatografía de afinidad precedente y la etapa de intercambio aniónico y/o no hay eliminación del quelante de iones de calcio del producto de la etapa de cromatografía de afinidad precedente antes de la aplicación del producto directo o indirecto a la etapa de intercambio aniónico.
12. Un procedimiento de recuperación y/o purificación de una proteína intracelular expresada de forma recombinante que comprende la secuencia de anexina A5 (AnxA5) de una célula huésped productora de endotoxinas con una
- 35 pared celular, o de un cultivo de la misma tal como se define en la reivindicación 5, en el que:
- (a) el procedimiento comprende liberar la proteína intracelular de la célula huésped productora de endotoxina en presencia de un tampón de homogeneización que comprende un detergente no iónico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2;
- 40 (b) opcionalmente, en el que la etapa de liberación está de acuerdo con la reivindicación 6 o 6(a);
- (c) además, opcionalmente, en el que el procedimiento comprende una etapa de aclarado del homogeneizado de biomasa según la reivindicación 6(b); y
- (d) en el que el procedimiento comprende, además, la etapa de someter la proteína AnxA5 liberada directa o indirectamente a una resina de intercambio aniónico, opcionalmente en presencia de un quelante de iones calcio, para realizar una primera etapa de intercambio aniónico, y así producir un primer producto de intercambio
- 45 aniónico que comprende la proteína AnxA5 liberada de acuerdo con la reivindicación 7; y
- (e) en el que el procedimiento comprende además la etapa de someter la proteína AnxA5 liberada directa o indirectamente a una etapa de cromatografía de afinidad, para producir así un primer producto de cromatografía de afinidad que comprende la proteína AnxA5 liberada, y
- (f) en el que el primer producto de cromatografía de afinidad es una composición que comprende la proteína
- 50 AnxA5 y un quelante de iones metálicos de calcio; y
- (g) en el que el producto directo o indirecto de la etapa de cromatografía de afinidad que comprende la proteína AnxA5 y el quelante de iones metálicos de calcio se somete a una etapa de intercambio aniónico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11;
- y preferentemente en el que ninguna de las etapas (a) a (g) incluyen, o se somete a la intervención de, una o más
- 55 etapas seleccionadas entre centrifugación y/o diálisis, y más preferentemente en el que la proteína AnxA5 permanece soluble, excepto por la unión temporal a las fases sólidas de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a lo largo de la procedimiento.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que:
- 60 (a) la etapa de cromatografía de afinidad de la etapa (e) de la reivindicación 12 comprende la unión de la proteína AnxA5 a la heparina inmovilizada, y en el que la unión es promovida por la presencia de iones de calcio,



- y, opcionalmente, en el que la proteína AnxA5 se eluye de la heparina inmovilizada que utiliza un tampón de elución que contiene un quelante de iones de calcio, tal como EDTA; y/o
- (b) en el que la etapa de cromatografía de afinidad de la etapa (e) de la reivindicación 12 comprende someter la solución que comprende la proteína AnxA5 y una o más impurezas a una etapa de cromatografía de afinidad de heparina en presencia de Tween80 (preferentemente en presencia de Tween80 al 0,1 %), para producir así el primer producto de cromatografía de afinidad que comprende la proteína AnxA5 liberada; y preferentemente en el que la proteína AnxA5 permanece en solución durante todo el procedimiento, incluyendo cualquier etapa anterior o posterior, excepto cuando se une temporalmente a alguna resina cromatográfica.
14. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el procedimiento comprende preferentemente al final del procedimiento tal como se define en cualquier reivindicación precedente, una o más etapas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en concentración, cambio de tampón, acondicionamiento y filtración (tal como filtración estéril) y, opcionalmente, una etapa final de almacenamiento del producto que contiene la proteína AnxA5 en un recipiente estéril.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que:
- (a) una de las etapas adicionales es la diafiltración, opcionalmente en el que el producto de la etapa de diafiltración contiene la proteína AnxA5 en una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, 50 100 mg/mL o más;
- (b) la filtración utiliza un filtro de 0,45-0,2  $\mu$ m o un filtro de 0,22  $\mu$ m y es preferentemente una etapa de filtración estéril; y/o
- (c) la filtración estéril es la etapa de purificación final, antes de almacenar el producto que contiene la proteína AnxA5 en un recipiente estéril.
16. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, comprendiendo el procedimiento las etapas requeridas para proporcionar un producto de proteína AnxA5 estéril final en un tampón sin fosfato (tal como un tampón Bis-Tris o Tris) aproximadamente a pH 7,4, que comprende aproximadamente 150 mM de NaCl, aproximadamente 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, aproximadamente 0,05 % (p/p) de polisorbato (tal como Tween80) u otro detergente no iónico y, opcionalmente, en el que la concentración de la proteína AnxA5 en el producto de proteína AnxA5 estéril final es aproximadamente 10 mg/mL.
17. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, el cual proporciona:
- (a) un producto de proteína AnxA5 estéril final, en el que la concentración de NaCl presente mantiene la proteína AnxA5 en una forma que es predominantemente monomérica;
- (b) un rendimiento global de más de 1 g de proteína AnxA5 por L de cultivo de la célula huésped, más preferentemente al menos aproximadamente 1,5 g/L, incluso más preferentemente en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 g/L;
- (c) una recuperación global de la proteína AnxA5 de aproximadamente el 24 % en peso de la proteína AnxA5 presente en el cultivo de la célula huésped;
- (d) un producto que comprende la proteína de la célula huésped (distinta de la proteína AnxA5 expresada de forma recombinante) a un nivel inferior a 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 ng o menor por mg de proteína AnxA5;
- (e) un producto con un contenido de endotoxinas inferior a 100, 90, 80, 70, 60, 50 45, 40, 35, 30, 35, 20, 15 y, preferiblemente, inferior a 10, 5 o 1 UE por mg de AnxA5 proteína, y/o preferentemente el procedimiento proporciona un producto en forma de dosis unitaria y el producto contiene menos de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 35, 20, 15, y preferentemente menos de 10, 5 o 1 UE por dosis unitaria; y/o
- (f) un producto que comprende niveles de ácido nucleico de célula huésped inferiores a 1,000 pg por mg de proteína AnxA5, preferentemente inferiores a 100 pg por mg de proteína AnxA5, más preferentemente inferiores a 10 pg por mg de proteína AnxA5.
18. Una composición que comprende una proteína AnxA5, en la que la composición es el producto directo o indirecto de (o es obtenible directa o indirectamente por) el procedimiento de la reivindicación 13, o cualquier reivindicación dependiente de la misma, y en la que:
- (a) la composición se ha sometido a una etapa de filtración estéril y es una composición estéril;
- (b) la composición se almacena en un recipiente estéril;
- (c) la composición comprende proteínas no AnxA5, tal como la proteína de la célula huésped, a un nivel inferior a 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 ng o menor por mg de proteína AnxA5;
- (d) la composición presenta un contenido de endotoxinas inferior a 100, 50, 20, 10, 5 o 1 UE por mg de proteína AnxA5;
- (e) la composición contiene niveles de ácido nucleico, tales como niveles de ácido nucleico de la célula huésped, inferiores a 1.000 pg, 100 pg, o 10 pg por mg de proteína AnxA5; y
- (f) la proteína AnxA5 no contiene una etiqueta His.
19. La composición de la reivindicación 18:

- (a) que contiene la proteína AnxA5 en una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, 50 100 mg/mL o más;
- 5 (b) en la que la composición comprende un producto de proteína AnxA5 estéril en un tampón no fosfato (tal como tampón Bis-Tris o Tris) aproximadamente a pH 7,4, que comprende aproximadamente 150 mM de NaCl, aproximadamente 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, aproximadamente 0,05 % (p/p) de polisorbato (tal como Tween80) u otro detergente no iónico y, opcionalmente, en la que la concentración de la proteína AnxA5 en el producto de proteína AnxA5 estéril final es de aproximadamente 10 mg/mL;
- 10 (c) en la que la composición comprende NaCl en una concentración que mantiene la proteína AnxA5 en una forma que es predominantemente monomérica;
- (d) que comprende la proteína no AnxA5, tal como la proteína de la célula huésped, a un nivel inferior a 20 ng por mg de la proteína AnxA5 y, opcionalmente, en la que la proteína de la célula huésped está en un nivel detectable (aunque menor de 20 ng por mg de proteína AnxA5) en la composición;
- 15 (e) en la que la endotoxina está en un nivel detectable, aunque inferior a 100, 50, 20, 10, 5 o 1 EU por proteína AnxA5, en la composición;
- (f) que es un producto en forma de dosis unitaria y que contiene menos de 100, 50, 20, 10, 5 o 1 EU por dosis unitaria, y opcionalmente en la que la endotoxina se encuentra en un nivel detectable (aunque inferior a 100, 50, 20, 10, 5 o 1 UE por dosis unitaria) en la composición;
- 20 (g) que comprende niveles de ácido nucleico a un nivel detectable, aunque menos de 1.000 pg, 100 pg, o 10 pg por mg de proteína AnxA5, en la composición;
- (h) en la que el nivel de proteína AnxA5 gluconoilada en la composición está dentro del rango de 0,5 a 30 %, o de 0,5 a 20 %, o de 0,5 a 15 %, o de 0,5 a 10 % del contenido total de proteína AnxA5 en el producto;
- (i) en la que el nivel de proteína AnxA5 gluconoilada en el producto de la composición es inferior al 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % y, de preferencia, es sustancialmente 0 %;
- 25 (j) en la que la proteína AnxA5 no contiene uno o más motivos RGD; y/o
- (k) en la que la composición es una composición farmacéuticamente aceptable y/o veterinariamente aceptable.

20. Una composición de acuerdo con la reivindicación 18 o 19 para uso médico.

# ES 2 699 155 T3

**Fig 1**

```

Met Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe Asp
1           5           10           15

Glu Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly
           20           25           30

Thr Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg Ser Asn Ala
           35           40           45

Gln Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp
           50           55           60

Leu Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Lys Leu
65           70           75           80

Ile Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu
           85           90           95

Lys His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu
           100          105          110

Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val
           115          120          125

Tyr Glu Glu Glu Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp
           130          135          140

Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn
145           150          155          160

Arg Asp Pro Asp Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala
           165          170          175

Gln Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu
           180          185          190

Lys Phe Ile Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys
           195          200          205

Val Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr
           210          215          220

```

ES 2 699 155 T3

Ile	Asp	Arg	Glu	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Leu	Ala	Val
225					230					235					240
Val	Lys	Ser	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Ala	Tyr	Leu	Ala	Glu	Thr	Leu	Tyr
				245					250						255
Tyr	Ala	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Asp	His	Thr	Leu	Ile	Arg	Val
			260					265						270	
Met	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	Ile	Asp	Leu	Phe	Asn	Ile	Arg	Lys	Glu	Phe
		275						280						285	
Arg	Lys	Asn	Phe	Ala	Thr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Met	Ile	Lys	Gly	Asp	Thr
	290						295					300			
Ser	Gly	Asp	Tyr	Lys	Lys	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Glu	Asp	Asp
305					310						315				320

Fig 2

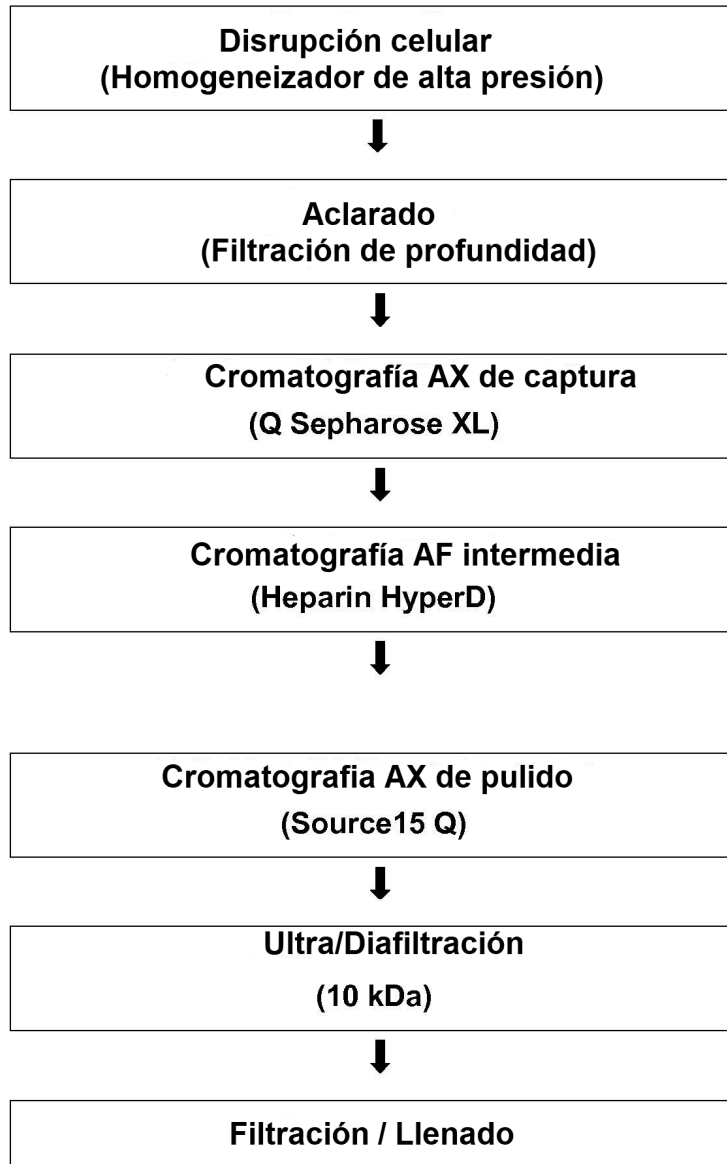


Fig 3

Etapa procedimiento	Parámetro	Procedimiento 3 L	Procedimiento 100 L
<b>AX</b>	▶ Resina: Columna: Diámetro columna (cm): Altura de lecho (cm): Volumen columna (L): Caudal: Temperatura tampón: Bomba:	Q Sepharose XL XK 50 5 13,5 0,265 200 cm/h Temperatura ambiente con bomba de tubo 323S WATSON-MARLOW	Q Sepharose XL BPG 300 30 13,5 9,5 170 cm/h Temperatura ambiente Sistema BioProcess
<b>EQ</b>	▼ Tampón A: Vol:	20 mM Tris pH 7,4, 0,1 % Tween80, 25 mM NaCl 2 VC	20 mM Tris pH 7,4, 0,1 % Tween80, 25 mM NaCl 3 VC
<b>Carga</b>			Dilución online (1+1) con 1% (v/v) Tween 80, 4 mM EDTA, pH 8,0
<b>Lavado</b>	▼ Tampón: Vol:	20 mM Tris pH 7,4, 0,1 % Tween80, 25 mM NaCl 10 VC	20 mM Tris pH 7,4, 0,1 % Tween80, 25 mM NaCl 10 VC
<b>Etapa Elución</b>	▼ 100 % Tampón B: Vol:	20 mM Tris pH 7,4, 0,1 % Tween80, 300 mM NaCl 9 VC	20 mM Tris pH 7,4, 0,1 % Tween80, 300 mM NaCl 9 VC
<b>Agrupación</b>	▼ Criterios:	Pico principal Conjunto (0,1 UA-0,2 UA)	Pico principal Conjunto (objetivo 0,2 UA-0,4 UA; 5 mm trayectoria luz)
<b>CIP</b>	▼ Etapa 1: Vol: Etapa 2: Vol: Incubación:	2 M NaCl 3 VC 1 M NaOH 3 VC 15 h	(dentro de 3 semanas) 2 M NaCl 3 VC 1 M NaOH 3 VC 15 h
<b>Almacenamiento</b>	▼ Almacenamiento:	20 mM NaOH	10 mM NaOH

Fig 4

Etapa procedimiento	Parámetro	Procedimiento 3 L	Procedimiento 100 L
AF	Resina: Columna: Diámetro columna (cm): Altura lecho (cm): Volumen columna (L): Caudal: Temperatura tampón:	Heparin HyperD XK 50 5 25 0,491 60-100 cm/h Temperatura ambiente	Heparin HyperD BPG300 30 25 17,7 60-100 cm/h Temperatura ambiente
EQ	Tampón A: Vol:	20 mM Tris pH 7,4; 0,1 % Tween80; 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCl 2 VC	20 mM Tris pH 7,4; 0,1 % Tween80; 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCl 3 VC
Carga	Caudal:	100 cm/h	60-100 cm/h; dilución online 1:8 de eluato AX con tampón A
Lavado 1	Tampón: Vol: Caudal:	20 mM Tris pH 7,4; 0,1 % Tween80; 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCl 15 VC 100 cm/h	20 mM Tris pH 7,4; 0,1 % Tween80; 2 mM CaCl <sub>2</sub> , 25 mM NaCl 15 VC 60-100 cm/h
Lavado 2	Tampón: Vol: Caudal:	20 mM Tris pH 7,4; 0,1 % Tween80, 25 mM NaCl 2 VC 100 cm/h	20 mM Tris pH 7,4; 0,1 % Tween80, 25 mM NaCl 2 VC 60-100 cm/h
Etapa Elución	100 % Tampón B: Vol: Caudal:	20 mM Tris pH 7,4; 0,1 % Tween80; 10 mM EDTA; 25 mM NaCl 2-3 VC 40-60 cm/h	20 mM Tris pH 7,4; 0,1 % Tween80; 10 mM EDTA; 25 mM NaCl 2-3 VC 40-60 cm/h
Agrupación	Criterios:	Pico completo Conjunto (0,1 UA-0,1 UA)	Pico completo Conjunto (0,2 UA-0,2 UA; 5 mm trayectoria luz)
CIP	Etapa 1: Vol: Etapa 2: Vol: Incubación:	2 M NaCl 3 VC 0,1 M NaOH 3 VC 15 h	(dentro de 3 semanas) 2 M NaCl 3 VC 0,1 M NaOH 3 VC ≥15 h (tiempo de contacto, sin bombeo)
Almacenamiento	Almacenamiento:	1 M NaCl, 25% EtOH	1 M NaCl, 25% EtOH

Fig 5

Etapa procedimiento	Parámetro	Procedimiento 3 L	Procedimiento 100 L
<b>AX</b>	Resina: Columna: Diámetro columna (cm): Altura lecho (cm): Volumen columna: Caudal: Temperatura tampón:	Source15 Q - - 15 0,4 100 cm/h Temperatura ambiente	Source15 Q Fineline200 20 15 4,7 100 cm/h Temperatura ambiente
<b>EQ</b>	Tampón A: Vol:	20 mM Bis-Tris pH 7; 25 mM NaCl 2 VC	20 mM Bis-Tris pH 7; 25 mM NaCl 3 VC
<b>Carga</b>	Caudal:	100 cm/h	100 cm/h AF pool splitting (1/4-1/5)
<b>Lavado</b>	Tampón: Vol: Caudal:	20 mM Bis-Tris pH 7; 25 mM NaCl 3 VC 100 cm/h	20 mM Bis-Tris pH 7; 25 mM NaCl 3 VC 100 cm/h
<b>Elución de gradiente</b>	Tampón B: Gradiente:	20 mM Bis-Tris pH 7; 180 mM NaCl 0-100% Ben33 VC	20 mM Bis-Tris pH 7; 180 mM NaCl 0-100% Ben33 VC
<b>Agrupación</b>	Criterios:	pico principal a partir de 0,05 UA hasta el valle entre el pico 1 y el pico 2	pico principal a partir de 0,1 UA hasta el valle entre el pico 1 y el pico 2 (5 mm trayectoria luz)
<b>CIP</b>	Etapa 1: Vol: Etapa 2: Vol: Incubación:	2 M NaCl 3 CV 1 M NaOH 3 CV 15 h	(dentro de 3 semanas) 2 M NaCl 3 CV 1 M NaOH 3 CV ≥15 h (tiempo de contacto, sin bombeo)
<b>Almacenamiento</b>	Almacenamiento:	25 mM NaOH	10 mM NaOH



Fig 6

Etapa procedimiento	Parámetro	Procedimiento 3 L	Procedimiento 100 L
Concentración	casete: área: concentración objetivo: tiempo procesamiento: parámetro: factor concentración	Hydrosart 10 K 0.1 m <sup>2</sup> 5 g/L ~ 2h TMP 0.9-1.1 Presión de entrada 1 bar Presión posterior de retención 0,8 bar ~ 6	Hydrosart 10 K 2.4 m <sup>2</sup> 5 g/L - TMP 0.9-1.1 Presión de entrada 1 bar Presión posterior de retención 0,8 bar 6-8
Cambio tampón	▶ Tampón dilución: Volúmens diafiltración: Factor concentración Concentración objetivo: Dilución:	20 mM Bis-Tris, 150 mM NaCl, 1mM CaCl <sub>2</sub> pH 7 10 ~ 6 12 g/L Adición de lavado de casete	20 mM Bis-Tris, 150 mM NaCl, 1mM CaCl <sub>2</sub> pH 7 10 ~ 6 12 g/L Adición de lavado de casete
Adición de Tween80	▶ Tampón: Concentración objetivo Tween 80: Concentración objetivo materiales:	20 mM Bis-Tris, 150 mM NaCl, 1mM CaCl <sub>2</sub> , 10 % Tween80 pH 7 0,05 % 10 g/L	20 mM Bis-Tris, 150 mM NaCl, 1mM CaCl <sub>2</sub> , 10 % Tween80 pH 7 0,05 % 10 g/L
Filtración estéril	▶ Dispositivo: Corte: Concentración objetivo materiales:	Sartopore2 0.45-0,2 µm 10 g/L	Sartopore2 0,45-0,2 µm 10 g/L
Almacenamiento de materiales	▶ Temperatura:	2-8°C	2-8°C

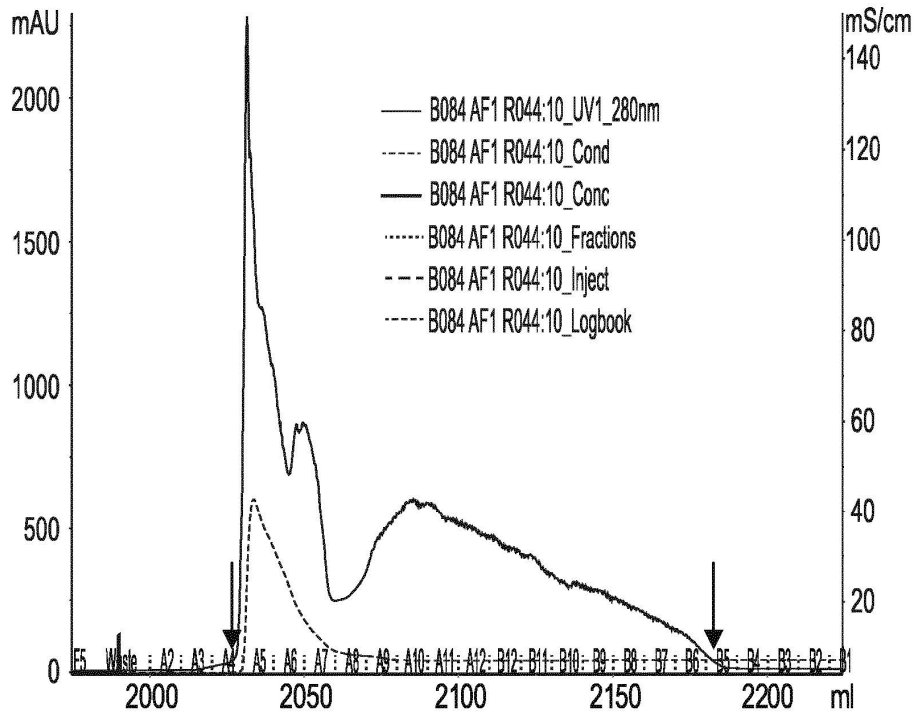


FIG. 7A

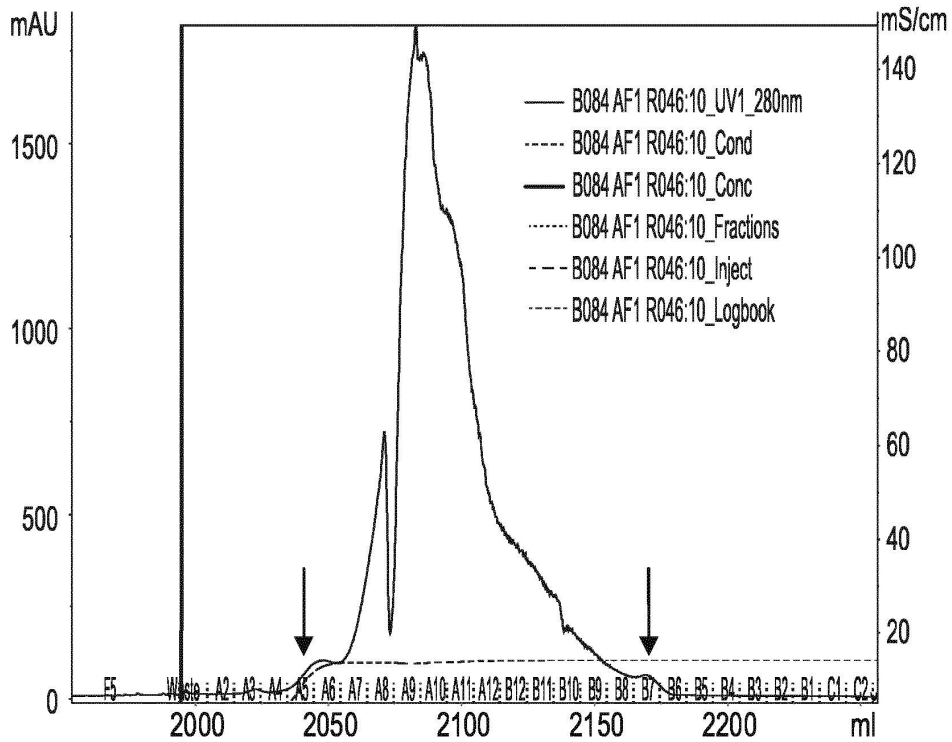


FIG. 7B